

# **Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren zur Genregulation und Antibiotikatherapie**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium genehmigte

Dissertation

von Diplom-Biochemiker  
Karl Ludwig von Laer aus Detmold

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Beatrix Süß  
Zweitberichterstatter: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer

Tag der Einreichung: 1. November. 2012  
Tag der mündlichen Prüfung: 1. Februar 2013

Darmstadt 2013  
(D17)

meinen Eltern

"Eine gefasste Hypothese gibt uns Luchsaugen für alles sie Bestätigende,  
und macht uns blind für alles ihr Widersprechende."

*Arthur Schopenhauer*  
*(Die Welt als Wille und Vorstellung, Zweiter Band, Zum zweiten Buch, Kapitel 19)*

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Beatrix Süß danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in ihrem Labor durchführen zu können. Ich danke Ihr für die häufige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion. Darüber hinaus danke ich ihr für das in mich gesetzte Vertrauen und den Freiraum, eigene Ideen auszuprobieren und zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. H. Ulrich Göringer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke dem Suesslab für die schöne Arbeitsatmosphäre während der Frankfurter Zeit. Für anregende Gespräche rund um die Aptamere danke ich vor allem Alex und Markus sowie Julia und Michael. Alex danke ich außerdem für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke Philip Wurm für den hilfreichen Austausch bei den Proteinpräparationen, Franca Klingler für die Diskussionen über die NDM1-Inhibition sowie Anna Wacker für die fröhliche Deoswitch-Kooperation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter Mayer und seiner Arbeitsgruppe für den lehrreichen Aufenthalt an der Universität Bonn.

Ich danke meinen Praktikanten, Bachelor- und Diplomstudenten Flo, Ronni, Michael und Simon für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Bereitschaft sich für meine Arbeit begeistern zu lassen.

Ich danke der Stiftung Polytechnische Gesellschaft Frankfurt am Main für die ideelle und finanzielle Unterstützung im Rahmen des MainCampus Doktorandenstipendiums.

Ich danke meiner Frau Anna-Victoria, die mich immer unterstützt hat.

# Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung .....	2
2.1	Selektion von Aptameren .....	2
2.1.1	Pooldesign .....	2
2.1.2	Selektion .....	3
2.2	Genregulation durch Aptamere .....	6
2.2.1	Synthetische RNA-Schalter .....	7
2.2.2	Natürliche RNA-Schalter .....	7
2.2.3	Purin-bindende RNA-Schalter .....	10
2.3	Medizinische Anwendung von Aptameren .....	12
2.3.1	Stabilität .....	12
2.3.2	Diagnostik.....	13
2.3.3	Therapie.....	14
2.4	Zielstruktur der <i>in vitro</i> Selektion .....	15
2.4.1	Die Zellwand und PBP .....	16
2.4.2	Bakterielle Resistenzfaktoren .....	16
2.4.3	Erreger und Zielproteine.....	17
2.5	Zielsetzung.....	18
3	Ergebnisse .....	19
3.1	Erste <i>in vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren gegen TEM1 .....	19
3.1.1	Der initiale Pool .....	19
3.1.2	Vorbereitung des Zielproteins TEM1 .....	21
3.1.3	Die <i>in vitro</i> Selektion.....	23
3.1.4	Auswertung der Selektion .....	26
3.1.5	Charakterisierung der Einzelsequenzen.....	27
3.2	Zweite <i>in vitro</i> Selektion .....	30
3.2.1	Der neue Initial-Pool.....	30
3.2.2	Neue Zielproteine .....	31
3.2.3	Verbesserte <i>in vitro</i> Selektion.....	33
3.2.4	Auswertung der Selektion .....	33
3.2.5	Anschlussselektionen.....	35
3.2.6	Charakterisierung der Einzelsequenzen.....	36
3.2.7	<i>Doped-Selex</i> .....	38
3.2.8	Bindemotive in D909 .....	38
3.2.9	Inhibitionstest D909 .....	40
3.2.10	Zusammenfassung der Selektionsergebnisse .....	41
3.3	Heterologe Expression von RNA-Schaltern.....	43

3.3.1	Der Adenin-Schalter <i>add</i> .....	43
3.3.2	Der Adenin-Schalter <i>pbuE</i> .....	45
3.3.3	2'dG-Schalter in <i>E. coli</i> .....	46
3.3.4	2'dG-Aptamere in <i>B. subtilis</i> .....	48
3.3.5	Zusammenfassung RNA-Schalter.....	49
4	Diskussion.....	51
4.1	Selex I.....	51
4.1.1	Kontinuität.....	51
4.1.2	Zeitaufwand.....	52
4.1.3	Unspezifische Anreicherung.....	53
4.1.4	Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose.....	54
4.2	Selex II.....	54
4.2.1	Aptamergenität.....	54
4.2.2	NDM1-Selektion.....	55
4.2.3	Inhibitions-Selex.....	56
4.2.4	Einzelsequenzanalyse.....	57
4.2.5	D909 <i>doped</i> Selex.....	57
4.2.6	D909 Minimalmotiv.....	58
4.2.7	D909 inhibiert NDM1.....	58
4.3	Heterologe Expression von RNA-Schaltern.....	60
4.3.1	Adeninabhängige Schalter.....	60
4.3.2	2'dG-abhängige Schalter.....	62
5	Material.....	65
5.1	Chemikalien.....	65
5.2	Puffer.....	67
5.3	Reaktionsansätze.....	68
5.4	Medien.....	70
5.5	Oligonukleotide.....	71
5.6	Plasmide.....	72
5.7	Stämme.....	74
5.8	Geräte.....	74
5.9	Enzyme.....	74
6	Methoden.....	76
6.1	Selex I.....	76
6.1.1	Initialer DNA-Pool.....	76
6.1.2	<i>In vitro</i> Transkription.....	76
6.1.3	Zielprotein an CNBr-aktivierte Sepharose koppeln.....	76
6.1.4	Selektion mittels Affinitätschromatographie.....	77
6.1.5	Reverse Transkription und PCR.....	77

6.2	Selex II .....	78
6.2.1	Initialer DNA-Pool .....	78
6.2.2	<i>In vitro</i> Transkription .....	78
6.2.3	Zielproteine an magnetische Beads koppeln .....	79
6.2.4	Selektion mittels magnetischer Beads .....	79
6.2.5	RT-PCR .....	80
6.3	Auswertung der Selektionen .....	80
6.3.1	Filterretention .....	81
6.3.2	Analyse der Einzelsequenzen.....	81
6.4	Proteinexpression.....	82
6.4.1	Überexpression.....	82
6.4.2	Affinitätschromatographie .....	83
6.5	$\beta$ -Lactamase Aktivitätstest .....	83
6.6	$\beta$ -Galactosidase Aktivitätstest .....	84
6.6.1	Klassische Methode in <i>E. coli</i> .....	84
6.6.2	Hochdurchsatzmethode in <i>E. coli</i> (96well).....	85
6.6.3	Klassische Methode in <i>B. subtilis</i> .....	86
6.7	Standardmethoden .....	86
6.8	Transformation in <i>B. subtilis</i> .....	87
7	Anhang .....	88
7.1	Erste <i>in vitro</i> Selektion.....	88
7.2	Zweite <i>in vitro</i> Selektion .....	90
7.3	RNA-Schalter .....	94
8	Literatur.....	109

# 1 Zusammenfassung

RNA-Aptamere sind vielseitige Moleküle, die ein breites Spektrum von Liganden mit hoher Spezifität und Affinität binden, und die durch *in vitro* Selektion entwickelt werden. In dieser Arbeit werden die Möglichkeiten einer therapeutischen Anwendung von RNA-Aptameren als Antibiotika beschrieben. Nach jahrzehntelangem Einsatz von Antibiotika haben viele Bakterienstämme Resistenzen entwickelt, wodurch ein hoher Bedarf nach neuen Wirkstoffen besteht. Ein vor wenigen Jahren entdeckter Resistenzfaktor ist die Neu Dehli Metallo- $\beta$ -Lactamase NDM1, die sich in kurzer Zeit über die ganze Welt verbreitet hat. NDM1 spaltet Carbapeneme, die als Breitbandantibiotika der letzten Reserve lange Zeit zurückgehalten wurden. Die Selektion gegen NDM1 führte zu einer spezifischen Anreicherung von bindenden RNA-Sequenzen, die Einzelsequenz D909 zeigte dabei die besten Bindungseigenschaften. Ein Bindemotiv im 5'-Bereich von D909 konnte identifiziert werden. D909 inhibierte spezifisch NDM1 in einem nitrocefinbasierten Enzymaktivitätstest. Diese Studie zur RNA-basierten Inhibition von NDM1 legt den Grundstein für neue Therapieansätze zur Bekämpfung multiresistenter Bakterien. Den evolvierenden Krankheitserregern wird durch die *in vitro* Selektion eine evolutive Antibiotika-Entwicklung entgegengesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Genschalter für prokaryotische Systeme entwickelt. Natürliche RNA-Schalter wurden auf regulatorische Aktivität in Nicht-Wirtorganismen untersucht. Die Adeninschalter *add* aus *Vibrio vulnificus* und *pbuE* aus *Bacillus subtilis* konnten in ein *Escherichia coli* basiertes Reportersystem implementiert werden. Der 2'dG-abhängige *mfl*-Schalter aus *Mesoplasma florum* wurde in *E. coli* und in *B. subtilis* eingesetzt. In *B. subtilis* wurde durch den *mfl*-Schalter eine 90%ige Repression der Reporterogenaktivität erreicht. Dabei wurde die *mfl*-Aptamerdomäne in den *xpt*-Schalter integriert und so ein synthetischer RNA-Schalter aus natürlichen Komponenten entwickelt. Im Gegensatz dazu stand eine Variante von *mfl*, das künstliche *hybrid*-Aptamer. Dieses war *in vitro* bindungskompetent, besaß aber keine regulatorische Funktion *in vivo*. Am Beispiel der 2'dG-Aptamere konnte gezeigt werden, dass helikale Bereiche und Tertiärstrukturelemente der Purin-Aptamere zwar mutiert werden können, ohne die charakteristische Faltung oder Bindungskompetenz *in vitro* zu beeinflussen. Die biologische Funktion des Aptamers dagegen ist sensibel von der Nukleotidsequenz abhängig.

## 2 Einleitung

Das zentrale Motiv der Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung von RNA-Aptameren. Diese vielseitigen Moleküle binden eine breite Spanne von Liganden mit hoher Spezifität und Affinität. Sie können durch künstliche Selektion entwickelt werden, finden sich aber auch in der Natur, vor allem in der prokaryotischen Domäne des Lebens. Aptamere können als Genschalter, aber auch in der medizinischen Diagnostik und Therapie eingesetzt werden. In dieser Arbeit werden die Möglichkeiten einer therapeutischen Anwendung von RNA-Aptameren als Antibiotika beschrieben und neue Genschalter für prokaryotische Systeme entwickelt. Beide Teile der Arbeit sind in der synthetischen Biologie angesiedelt, in der molekularbiologische Bausteine und Konzepte kombiniert werden, um neue Funktionalitäten zu schaffen.

### 2.1 Selektion von Aptameren

Aptamere werden durch künstliche Selektion entwickelt. Die Methode der künstlichen Selektion wird *in vitro* Selektion oder Selex genannt. Selex steht für *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* und wurde 1990 zum ersten Mal beschrieben (1,2). Durch diese Methode werden aus einer Oligonukleotid-Bibliothek RNA- oder einzelsträngige DNA-Moleküle selektiert, die spezifisch an einen Liganden binden können. Diese Moleküle werden Aptamere genannt und zeichnen sich durch eine komplexe dreidimensionale Struktur aus, die durch die Nukleotidsequenz definiert wird. In dieser Arbeit wurden ausschließlich RNA-Selektionen durchgeführt. Mit Hilfe der Selex wurden bereits zahllose hochaffine und hochspezifische Aptamere entwickelt, deren Bindungseigenschaften vergleichbar mit monoklonalen Antikörpern sind (3). Die Entwicklung der Aptamere ist aber nicht wie bei monoklonalen Antikörpern an Organismen gebunden, sondern wird *in vitro* durchgeführt. Es kommen ausschließlich molekularbiologische Standardmethoden zum Einsatz wie Transkription, reverse Transkription und PCR. Dadurch ist die *in vitro* Selektion von Aptameren schneller und kostengünstiger als die Entwicklung monoklonaler Antikörper. Der erste Schritt der Selex ist das Design und die Herstellung eines initialen Pools.

#### 2.1.1 Pooldesign

Die *in vitro* Selektion basiert auf einer Bibliothek von zufälligen RNA-Sequenzen, auch randomisierte Sequenzen oder RNA-Pool genannt. Bei der Selektion von Aptameren liegt die Länge der Zufallssequenz zwischen 30 und 70 Nukleotide (nt) (4). Die Anzahl an individuellen Sequenzen, die bei einer bestimmten Sequenzlänge  $n$  möglich ist, wird Sequenzraum genannt und berechnet sich aus der Anzahl der eingesetzten Nukleotide in  $n$ -ter Potenz. In dieser Arbeit wurde ein 50 nt langer randomisierter Pool (N50) verwendet mit einem Sequenzraum von  $4^{50}$ . Das entspricht in etwa  $1,2 \times 10^{30}$  Sequenzen oder rund 1 Mmol ( $10^6$  mol). Bei einem Molekulargewicht von 30 000 g/mol



beträgt das Gesamtgewicht eines RNA-Pools über den gesamten Sequenzraum 30 000 Tonnen. Diese Menge würde einen kleinen Öltanker füllen und ist im Labormaßstab nicht handhabbar. In der Praxis hat sich gezeigt, dass etwa 1 nmol eines RNA-Pools für die *in vitro* Selektion ausreichend ist (4,5). Das liegt daran, dass nur wenige Nukleotide der N50-Sequenz an der Ligandenbindung beteiligt sind. Der Großteil der Nukleotide eines Aptamers ist für die Ausbildung von Sekundärstrukturen verantwortlich. Dabei kann die Sequenz variabel sein, solange sich spezifische Basenpaare bilden. Bindemotive mit beispielsweise zehn definierten Positionen werden durch 1 nmol eines N50-Pools mehr als ausreichend abgedeckt. Der Vorteil einer längeren Zufallssequenz ist, dass jedes kurze Motiv in verschiedenen Sequenzumgebungen präsentiert wird. Ein Motiv kann beispielsweise als zentrale Ausbuchtung in eine Haarnadelstruktur eingebettet sein (6,7) oder in einer Drei-Wege-Kreuzung liegen (8).

Die Zufallssequenz wird von konstanten Sequenzbereichen flankiert. Die konstanten Sequenzen werden für die PCR-Amplifikation und die *in vitro* Transkription benötigt. Weiterhin können die konstanten Bereiche mit Restriktionsschnittstellen oder anderen Funktionalitäten ausgestattet sein. Die konstanten Bereiche können auch die Struktur des Pools beeinflussen. Werden sie komplementär gewählt, werden Haarnadelstrukturen bevorzugt ausgebildet (4). In dieser Selektion wird das Pooldesign verwendet, das in Abbildung 1 dargestellt ist (9). Die konstanten Bereiche sind so gewählt, dass jeder für sich eine schwache Haarnadelstruktur ausbilden kann. Dadurch soll sich der N50-Bereich weitgehend unabhängig von den konstanten Bereichen falten, eine gemeinsame Faltung wird aber nicht ausgeschlossen (10). Die Poolsequenz beginnt mit einem CCAAG-Motiv, gefolgt von der T7-Promotorsequenz. Das CCAAG-Motiv ist eine optimierte Sequenz zur Steigerung der Transkriptionsrate (11).

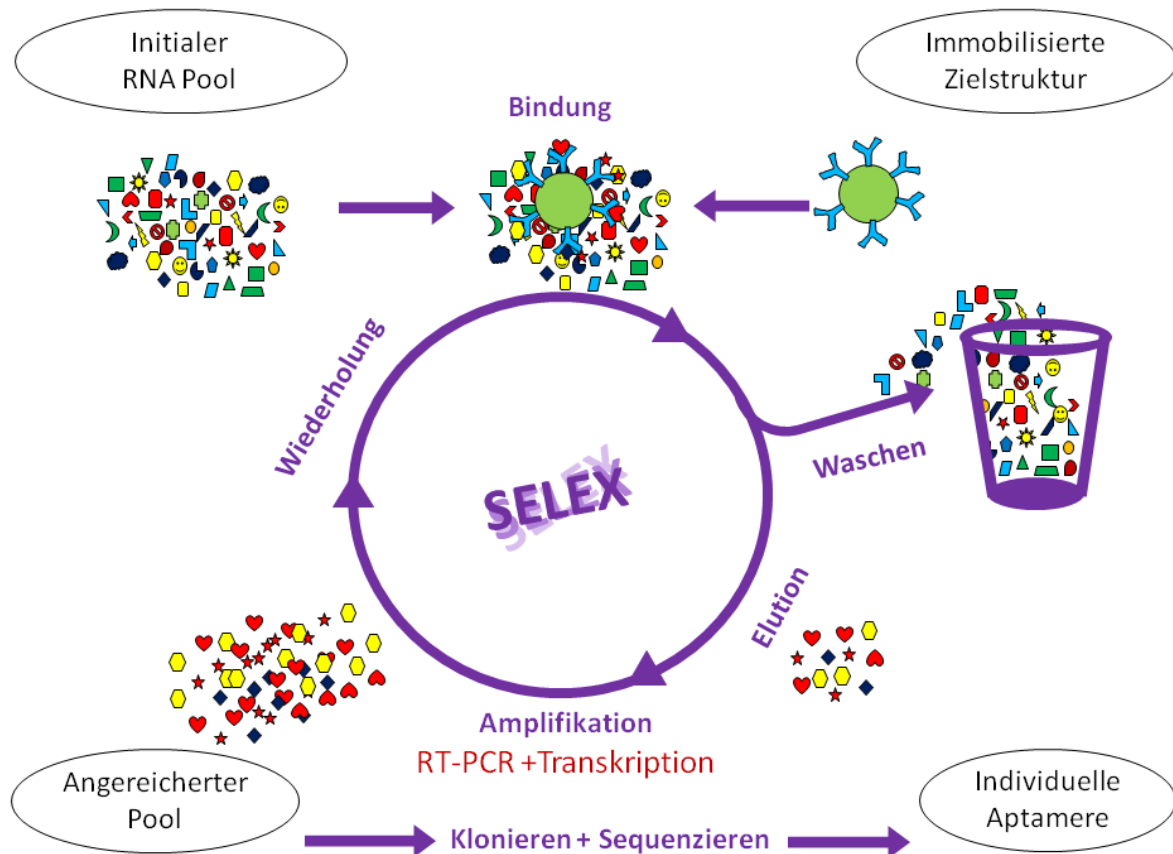
5'-CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAAN50GAGTTTCGTGGATGCCACAGGAC-3'

**Abbildung 1:** DNA-Pooldesign für *in vitro* Selektion von RNA-Aptameren. Rot: T7-Promotor, Gelb: 5'-konstanter Bereich, Grün: 3'-konstanter Bereich, N50: randomisierter Bereich mit 50 nt Länge

### 2.1.2 Selektion

Der grundsätzliche Ablauf einer SELEX ist ein Zyklus von Selektion und enzymatischer Amplifizierung. Es handelt sich um einen evolutionsähnlichen Prozess, an dessen Ende wenige an den Selektionsparametern optimierte Sequenzen stehen. Die Selektion beginnt mit der Herstellung eines initialen RNA-Pools nach den zuvor beschriebenen Kriterien. Der initiale Pool wird in den ersten Selektionsschritt eingesetzt und mit der Zielstruktur inkubiert. Bisher wurden Selektionen gegen Zielstrukturen wie Proteine, kleine Moleküle, Ionen, aber auch ganze Zellen durchgeführt (3). Die Zielstruktur wird meist an einer Matrix immobilisiert, von der nach Inkubation die ungebundenen RNA-Spezies abgewaschen werden können. Spezies, die die Zielstruktur binden, verbleiben an der

Matrix. Sie werden eluiert und durch reverse Transkription, PCR und Transkription in den RNA-Pool der nächsten Selektionsrunde umgewandelt. In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung der Selex abgebildet.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der *in vitro* Selektion, SELEX. Das Schema ist von oben links beginnend im Uhrzeigersinn zu lesen. Ein initialer RNA Pool wird mit der immobilisierten Zielstruktur inkubiert. Durch Waschen werden nicht-bindende RNA-Spezies aussortiert. Gebundene Spezies werden eluiert und zu einem neuen RNA Pool amplifiziert. Der neue angereicherte Pool wird dann wiederum mit der immobilisierten Zielstruktur inkubiert und der Zyklus wiederholt sich. Nach neun bis zwölf Zyklen wird der angereicherte Pool kloniert und sequenziert, um individuelle Aptamere zu charakterisieren. Abbildung variiert nach (3).

Als Matrix werden verschiedene Materialien verwendet. Für Proteinselektionen können Nitrozellulose-Filter eingesetzt werden (5,12). Für Proteine und kleine Moleküle eignet sich aktivierte Sepharose, an die die Zielstruktur kovalent gebunden wird (8,13). Hierzu wird Bromcyan- (CNBr) oder auch Epoxy-aktivierte Sepharose verwendet. Die Selektion erfolgt dann durch Säulenchromatographie. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung sind magnetische Sepharose-Kügelchen (*beads*). Diese können ebenfalls Epoxy-aktiviert oder Streptavidin-beschichtet sein (14). In dieser Arbeit werden Streptavidin-beschichtete magnetische *beads* eingesetzt. Die Zielproteine werden biotinyliert und über die Biotin-Streptavidin-Bindung an den magnetischen *beads* immobilisiert. Neben Biotin-Streptavidin werden auch andere Affinitätsmarkierungen in der Selektion eingesetzt, beispielsweise GST-Fusionen (15). Die Selektion kann generell mit jedem Verfahren

durchgeführt werden, das freie RNA von RNA im Komplex mit dem Zielmolekül trennen kann. Dazu zählen Durchflusszytometrie (16,17), Gelverzögerung (18,19), Oberflächen-Plasmonresonanz (20), Zentrifugation (21) oder Kapillarelektrophorese (22).

Das Waschen der Matrix ist wesentlich für die Stringenz der Selektion (23). Die Intensität und Häufigkeit der Waschschrte bestimmen, welcher Anteil der eingesetzten RNA an der Matrix verbleibt. In den ersten Runden wird meist sehr schonend und wenig gewaschen, um die Variabilität des Pools nicht zu schnell einzuschränken. Mit zunehmender Rundenzahl wird die Zahl der Waschschrte erhöht. Die Stringenz kann auch durch eine Veränderung des Waschpuffers gesteigert werden. In späteren Runden kann zum Beispiel der Salzgehalt der Pufferlösung geändert werden (24). Bei der Selektion gegen kleine Moleküle kann mit Derivaten des Zielmoleküls gewaschen werden, um die Spezifität des RNA-Pools zu steigern.

Die Elution der gebundenen RNA-Spezies von der Matrix ist ein entscheidender Schritt der Selektion. Es gibt generell zwei Arten der Elution. Bei der spezifischen Elution wird mithilfe der Zielstruktur selbst eluiert (25,26). Die Matrix wird mit einem Überschuss der Zielstruktur in Lösung inkubiert, wodurch die RNA-Spezies von der Matrix gelöst werden und an die Zielstruktur in Lösung binden. Dieses Verfahren wird vor allem bei der Selektion von kleinen Molekülen durchgeführt. Die spezifische Elution bietet den Vorteil, dass die RNA-Sequenzen nach der gewünschten Funktion eluiert werden, nämlich der Bindung an die Zielstruktur.

Die unspezifische Elution kann durch thermische (27) oder chemische (28) Denaturierung mit 8 M Harnstoff erfolgen. Die RNA-Sekundärstruktur, die für die Ligandenbindung notwendig ist, wird aufgelöst und sämtliche an der Matrix verbliebene RNA geht in Lösung. Wenn die Zielstruktur über Biotin-Streptavidin immobilisiert ist, kann ebenfalls thermisch eluiert werden. Bei 80°C löst sich die Biotin-Streptavidin-Bindung (29) und alle immobilisierten Zielstrukturen gehen in Lösung samt gebundener RNA-Spezies. Der Vorteil der unspezifischen Elution ist einerseits Zeitersparnis und andererseits der geringere Verbrauch an Zielstruktur. Ein Nachteil ist, dass auch RNA-Spezies eluiert werden können, die an die Matrix oder Gefäßwand binden.

Beobachtet man eine Anreicherung unspezifischer Sequenzen im RNA-Pool, kann eine negative Selektion oder eine Gegenselektion (*counter* Selex) durchgeführt werden. Beide Selektionen werden unter gleichen Bedingungen wie die Hauptselex durchgeführt mit jeweils einer Änderung. In der negativen Selektion ist keine Zielstruktur an der Matrix immobilisiert (26). Statt der Elutionsfraktion wird mit der Waschfraktion der Selektion weitergearbeitet, in der sich die RNA-Spezies anreichern, die nicht an die Matrix oder Gefäßwand binden. In der Elution befinden sich RNA-Spezies, die an die Matrix binden. Die Waschfraktion der negativen Selektion wird direkt in die Hauptselex

eingesetzt. Die Gegenselektion wird angewendet, um die Spezifität des Pools für das Zielmolekül gegenüber verwandten Strukturen zu steigern (30,31). Es wird eine Selektionsrunde gegen ein Derivat der Zielstruktur in die Selektion eingeführt. Wie bei der negativen Selektion wird auch hier mit der Waschfraktion weitergearbeitet. Die Elutionsfraktion wird verworfen, da die enthaltenen RNA-Spezies nicht spezifisch genug zwischen Zielstruktur und Derivat diskriminieren.

Der letzte Schritt eines Selektionszyklus ist die Amplifikation des angereicherten RNA-Pools durch RT-PCR und Transkription. Die Amplifikation trägt ebenfalls zu dem Ergebnis der Selex bei, da nicht alle Poolsequenzen gleich stark vervielfältigt werden (32). So kann es zu einer Anreicherung von Spezies im Pool kommen, die aufgrund ihrer Sequenz bevorzugt amplifiziert werden. Gleichzeitig können Spezies unterrepräsentiert sein, wenn sie eine stark ausgeprägte Sekundärstruktur besitzen, die die reverse Transkription verlangsamt. Der Pool sollte nach jeder Selektionsrunde in der Gelelektrophorese auf homogenes Laufverhalten geprüft werden. Überamplifikate bilden oft distinkte Banden aus, die von der Poolbande unterschieden werden können (10). Diese Spezies sind reine Amplifikationsartefakte und haben nicht die gewünschten Bindungseigenschaften. Dennoch, auch wenn keine Überamplifikate im Gel erkennbar waren, ist am Ende einer Selektion die häufigste Sequenz nicht notwendigerweise die mit den gewünschten Eigenschaften (33).

Es werden so viele Zyklen der Selektion durchlaufen, bis sich die Affinität des RNA-Pools zum Zielprotein nicht mehr steigern lässt. In den meisten Fällen werden neun bis zwölf Zyklen benötigt. Es wurden aber auch Selektionen mit einem einzigen Zyklus (34) und bis zu 18 Zyklen (8) durchgeführt. Danach wird der angereicherte RNA-Pool in einen bakteriellen Vektor kloniert, um individuelle Sequenzen zu isolieren. Die Sequenzen werden auf gemeinsame Motive und Sekundärstrukturen untersucht und ihre Bindungseigenschaften zum Zielprotein werden charakterisiert. Hierbei wird meist mit radioaktiv markierter RNA gearbeitet. Als Markierung wird in dieser Arbeit das sogenannte *body labeling* angewendet, bei der  $^{32}\text{P}$  markierte Nukleotide während der *in vitro* Transkription in die Sequenzen eingefügt werden (1,3). Radioaktiv markierte RNA ist in Protein-Bindungsstudien hochsensitiv detektierbar, zum Beispiel in Gelverzögerungsexperimenten oder Nitrozellulose-Filterretentionen.

## 2.2 Genregulation durch Aptamere

Im Folgenden werden RNA-basierte Genregulationsmechanismen beschrieben, an denen Aptamere beteiligt sind. Aptamere sind die Grundlage synthetischer und natürlicher RNA-Schalter (*riboswitches*). Der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt auf den natürlich vorkommenden Purin-Aptameren. Es soll zunächst ein Überblick über die Möglichkeiten Aptamer-basierter Genregulation

in synthetischen und natürlichen Systemen gegeben werden, dann wird die Klasse der Purinaptamere näher vorgestellt.

### 2.2.1 Synthetische RNA-Schalter

Aptamere aus *in vitro* Selektionen, die kleine Liganden binden können zur Genregulation eingesetzt werden. Das Tetrazyklin-Aptamer (8) beispielsweise wurde bereits vielseitig als synthetischer RNA-Schalter eingesetzt. In *Saccharomyces cerevisiae* kann durch den Einsatz des Tetrazyklin-Aptamers die Translationsinitiation konditional reguliert werden (35,36). Weiterhin ist es möglich, mit dem Tetrazyklin-Aptamer Spleißen zu regulieren. Kloniert man das Aptamer in unmittelbarer Nähe der 5'-Spleißstelle, kann diese konditional für das Spliceosom zugänglich gemacht werden (37). Die Ligandenbindung führt dann entweder zur Inhibition des Spleißens oder zum Überspringen des folgenden Exons (38). Andere Aptamere, die als künstliche RNA-Schalter verwendet wurden, binden Neomycin (39) oder Theophyllin (40,41).

Alternativ können Aptamere durch *in vitro* Selektion mit viroiden selbstspaltenden Ribozymen kombiniert werden (42,43). Die Selektion der Schalter verlief mit dem Ziel, allosterische Ribozyme zu entwickeln, die sich abhängig von der Ligandenbindung spalteten. Solche allosterischen Ribozyme können zur konditionalen Genexpression in Bakterien (44), *S. cerevisiae* (19) und humanen Zelllinien (45,46) eingesetzt werden. Die Ribozyme wurden in die 3'- oder 5'UTR eines Reportergens kloniert. In Anwesenheit des Liganden spaltet sich das Ribozym, wodurch die mRNA anfällig für Degradation wurde. Dadurch konnte eine Repression des Reportergens erreicht werden.

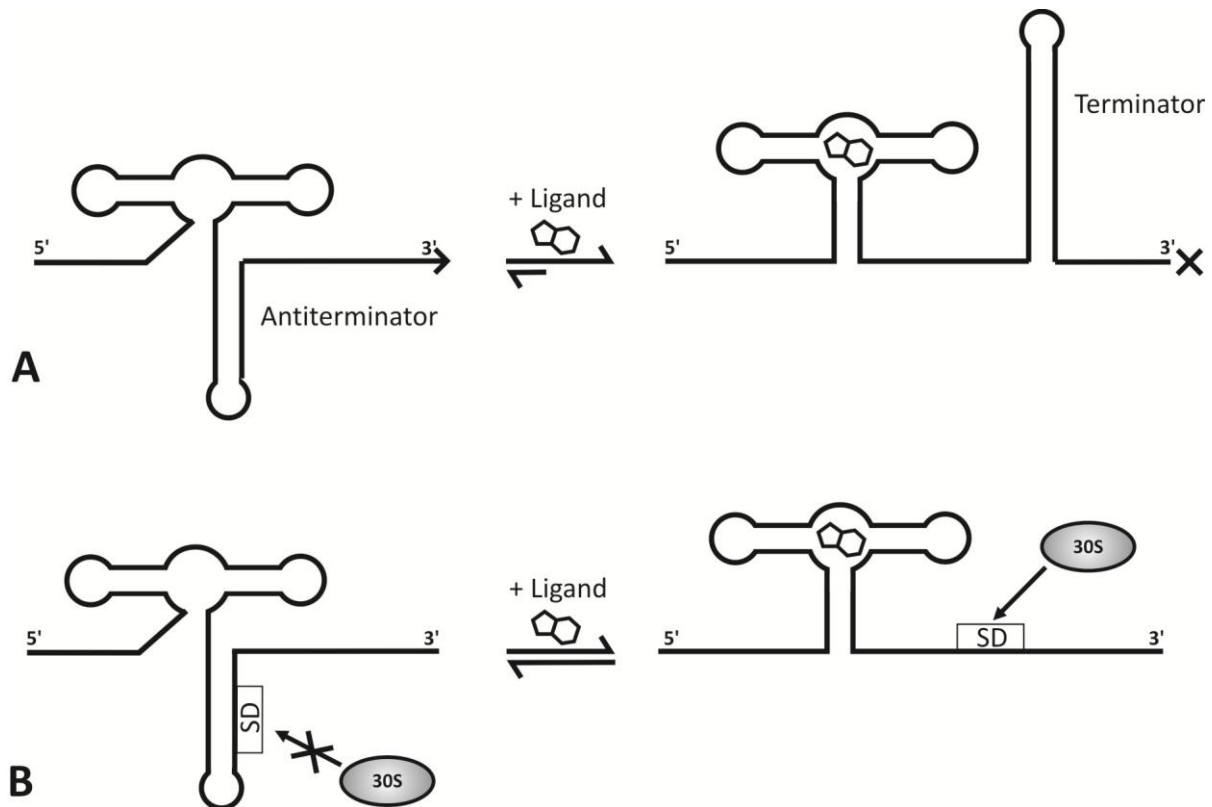
Aptamere können jedoch auch zur Genregulation eingesetzt werden, ohne auf der mRNA einen RNA-Schalter zu binden. Ein Beispiel dafür ist das TetR-bindende Aptamer, das die Genexpression auf transkriptioneller Ebene in *E. coli* reguliert (9). Es wurde eine *in vitro* Selektion gegen das bakterielle Repressorprotein TetR durchgeführt. Das darauffolgende *in vivo* Screening des angereicherten Pools resultierte in einem Aptamer, das eine TetR-kontrollierte Genexpression aktivieren kann. Das Aptamer verdrängt durch kompetitive Bindung TetR aktiv von der Operator-DNA (47). In einer Studie konnte TetR-Aptamer basierte Reportergenexpression in Säugetierzellen induziert werden (48).

### 2.2.2 Natürliche RNA-Schalter

Natürliche RNA-Schalter wurden vor etwa zehn Jahren zum ersten Mal beschrieben. Die Einführung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden sorgte um die Jahrtausendwende für einen sprunghaften Anstieg der bekannten Genome. In prokaryotischen Genomen wurden durch bioinformatische Vorhersageprogramme zahlreiche mögliche Sekundärstrukturelemente identifiziert und als RNA-Schalter klassifiziert (49). Diese RNA-Schalter wurden in der 5'UTR von mRNA gefunden und zeichnen sich durch einen modularen Aufbau aus. Das erste Modul ist die Aptamerdomäne, das

zweite die Expressionsplattform. Bindet das Aptamer den spezifischen Liganden, unterläuft der RNA-Schalter einen Konformationswechsel, der auch die Faltung der Expressionsplattform beeinflusst. Die veränderte Sekundärstruktur der Expressionsplattform induziert eine Modulation der Genexpression (50). Die Ligandenbindung führt bei einem An-Schalter zur Aktivierung der Genexpression, ein Aus-Schalter reprimiert sie.

Die Expressionsplattformen beeinflussen die Genexpression hauptsächlich durch zwei Mechanismen (51,52). Bei der transkriptionellen Regulation führt die Liganden-induzierte Konformationsänderung zur Ausbildung einer Terminatorstruktur, wie Abbildung 3A zeigt. Diese stabile Haarnadelschleife sorgt dafür, dass das naszierende mRNA-Transkript von der RNA-Polymerase abfällt und die Transkription abbricht. Die Geschwindigkeit der Polymerase definiert ein Zeitfenster für die Ligandenbindung. Nach Ablauf des Zeitfensters ist eine endgültige Entscheidung für die mRNA getroffen. Entweder bildet sich die Terminatorschleife und die Transkription bricht ab, oder die Ausbildung der Antiterminatorstruktur sorgt für die Fortsetzung der Transkription. Danach kann der RNA-Schalter die Genexpression nicht mehr beeinflussen. Zwischen Aptamer und Expressionsplattform befinden sich uridinreiche Sequenzen, an denen die Transkription verlangsamt ist. Diese Pausenstellen zögern die Entscheidung über den Abbruch der Transkription hinaus und geben Ligand und Aptamer zusätzliche Zeit für die Komplexbildung. Da die Geschwindigkeit der Polymerase und die Affinitätsrate  $k_{on}$  des Liganden zum Aptamer die Schalterposition bestimmen, spricht man von einem kinetischen Schalter.



**Abbildung 3: Funktion von RNA-Schaltern, schematische Darstellung. A transkriptioneller Repressor:** Ohne Ligand bildet die naszierende mRNA eine Antiterminatorstruktur, die Transkription läuft weiter. Die Bindung des Liganden führt zur Ausbildung des Aptamers und des Terminators, die Transkription bricht ab. Da die Ausbildung des Terminators eine *committed step* Reaktion darstellt, ist die Reaktion nur bedingt reversibel dargestellt. **B translationaler Aktivator:** Ohne Ligand wird die Shine-Dalgarno Sequenz (SD) in einer Haarnadelschleife maskiert. Die Ligandenbindung induziert eine Umfaltung, die die SD-Sequenz für die 30S ribosomale Untereinheit zugänglich macht. Die Umfaltung ist reversibel. Zu den dargestellten Mechanismen gibt es jeweils auch die Gegenstücke Translationaler Repressor und transkriptioneller Aktivator.

Der zweite Mechanismus reguliert die Genexpression auf translationaler Ebene (Abbildung 3B). Die Expressionsplattform befindet sich dafür unmittelbar stromaufwärts der kodierenden Sequenz. Die Ligandenbindung am Aptamer führt zur Ausbildung einer Haarnadelschleife, die die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno Sequenz, SD) maskiert. Die kleine ribosomale Untereinheit kann sich nicht an die mRNA anlagern und die Translationsinitiation ist inhibiert. Im Gegensatz zur transkriptionellen Regulation kann sich der Schalterzustand während der gesamten Lebenszeit der mRNA ändern. Die Konzentration des Liganden bestimmt über die Bindungskonstante  $K_D$  das Gleichgewicht von An- und Aus-Konformation des Schalters. Translationale Schalter werden daher thermodynamische Schalter genannt.

Natürliche RNA-Schalter regulieren zum großen Teil Gene und Operons des Metabolismus. Die Liganden der Schalter sind in der Regel Metaboliten (53,54). Sie regulieren in direkter Rückkopplung die Expression des Stoffwechselenzyms, dessen Substrat oder Produkt sie sind. Es wurden RNA-Schalter für Aminosäuren (55), Nukleobasen und Nukleotide (56) gefunden, weiterhin für Cofaktoren

(57) oder sekundäre Botenstoffe (58). Andere Schalter binden Ionen wie  $Mg^{2+}$  oder  $F^-$  (59,60) oder schalten als molekulare Thermometer temperaturabhängig (61).

### 2.2.3 Purin-bindende RNA-Schalter

In dieser Arbeit werden purinbindende RNA-Schalter untersucht. Diese Klasse von RNA-Schaltern wurde in vielen bakteriellen Spezies gefunden (56). Sie wurden bioinformatisch vorhergesagt und gezielt in Metabolit-regulierten Operons gesucht, bei denen der Regulationsmechanismus unbekannt war. Die Purin-Aptamere haben die charakteristische Sekundärstruktur einer T-Kreuzung, englisch: *three-way-junction* (53). In Abbildung 4 sind einige Purin-bindende Aptamere gezeigt. Das Basenpaar-Muster der RNA-Sequenz mit drei Stämmen, zwei terminalen Schleifen und der zentralen Kreuzung ist bei allen Purin-Aptameren zu finden. Die Sequenzen dagegen sind nur in den terminalen Schleifen und im Kreuzungsbereich konserviert. In Ligand-gebundener Form ähnelt das Aptamer der Form einer Stimmgabel (62). Purine binden im zentralen Kreuzungsbereich und werden von der Bindetasche völlig umschlossen. Der Ligand bildet mit insgesamt vier Nukleotiden im Kreuzungsbereich des Aptamers Bindungen aus (Abbildung 4A-D). Von 5' nach 3' gelesen handelt es sich um die erste Position von J1/2, sowie die zweite und vorletzte Position von J2/3. Besonders ist die Bindung mit dem Nukleotid an Position 74 in J3/1: Ligand und Aptamer bilden ein Watson-Crick Basenpaar. Eine nichtkomplementäre Mutation dieses Nukleotids führt zum Verlust der Ligandenbindung. Erstaunlicherweise kann die Ligandenspezifität des Aptamers durch die Mutation verändert werden. Aus einem Guanin-Aptamer wird durch die Mutation von C nach U ein Adenin-Aptamer (63).

Ein wichtiges Tertiärstruktur-Element der Purinaptamere ist die Interaktion der terminalen Schleifen L1 und L2, die englisch *loop loop interaction* genannt wird. Die gesamte Aptamerstruktur wird durch diese Interaktion organisiert und die Ligandenbindung unterstützt (64). Die *loop loop interaction* ist ein unabhängiges Strukturmerkmal, das sich auch in Abwesenheit des Liganden (53) oder auch der T-Kreuzung (65) ausbildet. Die Aptamerdomäne der Purinschalter hat eine konservierte Struktur, die Expressionsplattformen sind dagegen variabel. Es gibt Beispiele für An- und Aus-Schalter und sowohl transkriptionell als auch translational regulierende Purin-Schalter (56).



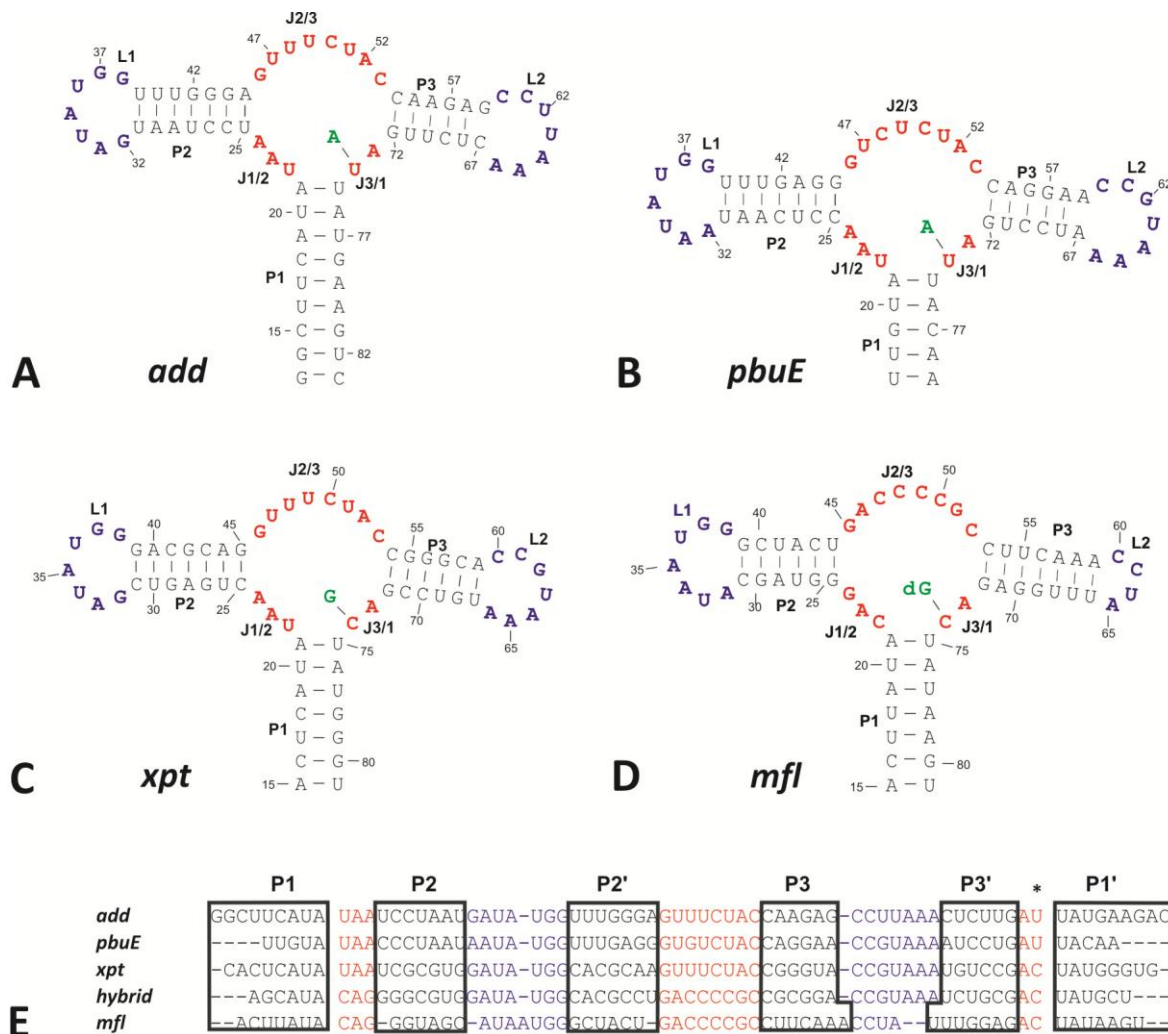


Abbildung 4: A-D Sekundärstrukturen der bezeichneten Aptamere, rot: zentraler Kreuzungsbereich, Blau: terminale Schleifen, Grün: Ligand. In Fett sind die Stämme P1 bis P3, die terminalen Schleifen L1 und L2, sowie die Verbindungen J1/2 - J3/1 bezeichnet. Die Nummerierung erfolgt nach dem natürlichen Transkriptionsstart von *xpt* (53), die Nummerierung der anderen Aptamere ist daran angepasst. E Alignierte Aptamer-Sequenzen, Sekundärstrukturen P1-P3 sind durch Kästen gekennzeichnet. Der Stern markiert die Position des Nukleotids mit Watson-Crick-Bindung zum Liganden.

In dieser Arbeit werden die Adenin-bindenden An-Schalter *add* aus *Vibrio vulnificus* und *pbuE* aus *Bacillus subtilis* verwendet. Dabei ist *add* ein translational und *pbuE* ein transkriptionell regulierter Schalter. Weiterhin werden die transkriptionellen Aus-Schalter *xpt* aus *B. subtilis* und *mfl* aus *Mesoplasma florum* eingesetzt. Der *xpt*-Schalter bindet Guanin, *mfl* 2'-Deoxyguanosin (2'dG). Die benannten Schalter regulieren die in 3' liegenden Gene, die sämtlich für Proteine des Purin-Stoffwechsels codieren (siehe Tabelle 1). Das *hybrid*-Aptamer ist eine rational designte Kombination aus *xpt* und *mfl* (66). Die Bindungstasche stammt aus *mfl*, das restliche Aptamer basiert auf der *xpt*-Sequenz, wobei die Stämme mit zusätzlichen GC-Basenpaaren stabilisiert sind. Der Sequenzvergleich der Aptamere in Abbildung 4E zeigt viele Übereinstimmungen zwischen *add*, *pbuE* und *xpt*. Die Aptamere stimmen vor allem in den terminalen Schleifen und dem Kreuzungsbereich überein. *Mfl* dagegen hat im Kreuzungsbereich eine komplett andere Sequenz, die Nukleotide der

Ligandenbindung sind nicht konserviert. Die terminale Schleife L2 von *mfl* ist verkürzt, weist aber die konservierte Sequenz für die tertiäre Interaktion mit L1 auf. Der P1-Stamm von *mfl* ist dafür ähnlich zu *xpt* und *add*, *pbuE* dagegen hat einen deutlich kürzeren P1-Stamm. In Tabelle 1 sind die wesentlichen Merkmale der Schalter zusammengefasst. Die  $K_D$ -Werte sind aus der Literatur übernommen (51,56).

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten RNA-Schalter

Name	<i>add</i>	<i>pbuE</i>	<i>xpt</i>	<i>mfl</i>
<b>Ligand</b>	Adenin	Adenin	Guanin	2'-Deoxyguanosin
<b><math>K_D</math> in nM</b>	300	300	5	80
<b>reguliert</b>	Translation	Transkription	Transkription	Transkription
<b>An/Aus</b>	An	An	Aus	Aus
<b>Reguliertes Gen</b>	Adenin Deaminase	Adenin Exporter	Phosphoribosyl Transferase	Ribonukleotid Reduktase
<b>Organismus</b>	<i>V. vulnificus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. florum</i>

## 2.3 Medizinische Anwendung von Aptameren

Aptamere können auch im medizinischen Bereich eingesetzt werden. In diagnostischen Verfahren, in denen Antikörper eingesetzt werden, stellen Aptamere eine Alternative dar. Weiterhin gibt es vielversprechende Ansätze zur Therapie mit Aptameren. Der limitierende Faktor, der allerdings zunächst bei der medizinischen Anwendung überwunden werden muss, ist die geringe Stabilität von RNA.

### 2.3.1 Stabilität

Der Einsatz von RNA wird oft durch ihre geringe Stabilität limitiert. Die Instabilität der RNA wird hauptsächlich durch die 2'-OH-Gruppe der Ribose verursacht. Sie ermöglicht eine hydrolytische Spaltung der Esterbindung von Phosphat und 3'-C der Ribose. Die Spaltung ist bei alkalischem pH-Wert und einer *in line* Konformation des RNA-Rückgrats begünstigt (67). Diese Konformation wird vor allem von flexibler ssRNA eingenommen, deutlich seltener von gefalteter dsRNA. Die Spaltungsreaktion kann deshalb auch zur Strukturbestimmung eingesetzt werden. Inkubiert man RNA für mehrere Tage bei Raumtemperatur und analysiert sie dann durch hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), treten Spaltprodukte bestimmter Längen häufiger auf. Anhand des Spaltmusters können Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur der RNA gezogen werden.

Zusätzlich zur intrinsischen Instabilität der RNA wird die Spaltungsreaktion von einer Fülle von Ribonukleasen (RNasen) katalysiert. Sie finden sich im menschlichen Blutplasma (68) und werden von Bakterien sezerniert (69,70). Die Halbwertszeit unmodifizierter RNA in Blut beträgt in manchen Fällen lediglich zwei Minuten (71). Um eine medizinische Anwendung der RNA in biologischen Systemen zu ermöglichen, muss sie durch chemische Modifikationen stabilisiert werden. Weiterhin können Aptamere mit hochmolekularem Polyethylenglycol (PEG) konjugiert werden, um ihre Ausscheidung durch die Nieren zu verlangsamen (72).

Die Möglichkeiten zur Stabilisierung von RNA durch chemische Modifikationen sind vielseitig (73). Fortschritte in der Synthese modifizierter RNA-Moleküle haben ihre Herstellung effizienter, verlässlicher und günstiger gemacht (74). In klinischer Anwendung wurden folgende Modifikationen bislang eingesetzt. Eine der ersten Modifikationen war der Austausch eines Phosphat-Sauerstoffs, der nicht an der Phosphodiesterbindung beteiligt ist, gegen Schwefel (75). Gute Erfolge wurden durch Modifikation der 2'OH-Gruppe erzielt (74,76). Eine Substitution der 2'OH-Gruppe durch eine 2'-Fluoro- oder 2'-O-methyl-Gruppe stabilisiert die RNA und schützt vor dem Abbau durch RNasen (77). In manchen Fällen ist bereits eine Modifikation am 3'- und 5'-Ende mit jeweils einem Deoxyribonukleotid für eine Stabilisierung ausreichend (78). Noch stabilere Aptamere können aus *locked nucleic acids* (LNA) generiert werden (79). Bei dieser Modifikation führt der Einbau einer Methylenbrücke vom 2'O zum 4'C der Ribose zu einem bicyclischem Ribonukleotid. Bei den genannten Modifikationen bleibt die RNA-typische 3'C-endo Konformation der Ribose erhalten. Watson-Crick-Baasenpaarungen bleiben begünstigt und die Bindungseigenschaften des Aptamers werden nicht beeinflusst.

Eine elegante Variante der Stabilisierung ohne neue chemische Gruppen einzufügen ist der Einsatz von enantiomerer L-RNA (80,81). Aptamere aus L-RNA werden auch Spiegelmere genannt. Die Entwicklung eines Spiegelmers erfolgt durch *in vitro* Selektion mit natürlicher RNA gegen das Enantiomer des Zielmoleküls, etwa ein aus D-Aminosäuren synthetisiertes Protein. Das Spiegelmer des selektierten Aptamers bindet dann das natürliche Protein, ist aber vor dem Abbau durch RNasen geschützt. Eine Alternative zur chemischen Modifikation ist die *ex vivo* Applikation (82). Hierbei werden dem Patienten Zielzellen entnommen, genetisch modifiziert und wieder in den Patienten gegeben. Die genetische Modifikation erfolgt über virale Vektoren, die die Expression der therapeutischen RNA im Organismus gewährleisten.

### 2.3.2 Diagnostik

Die Möglichkeiten der chemischen Modifikation von Aptameren wurden im letzten Abschnitt beschrieben. Der modulare Aufbau der Aptamere ermöglicht darüber hinaus die Immobilisierung auf diverse Träger- oder Oberflächenmaterialien. Diese Eigenschaften begünstigen den Einsatz von

Aptameren als Biosensoren für *array*-Technologien. Die Kopplung von molekularer Erkennung durch Aptamere mit einer Signalgenerierung ermöglicht die Entwicklung vielseitiger Detektionssysteme. Die meisten Technologien beruhen auf optischer Detektion von Fluoreszenz-markierten Aptameren (83,84). Andere Detektionsmethoden basieren auf Elektrochemie (85), oder Nanopartikeln (86,87).

Ein frühes Beispiel ist ein Biosensor, der IgE Antikörper erkennt (88). IgE-bindende DNA-Aptamere werden kovalent auf eine goldbeschichteten Quarzkristall-Oberfläche aufgebracht. Die Detektion erfolgt optisch durch Oberflächenplasmonresonanz. Durch dieses Verfahren kann das Molekulargewicht der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle bestimmt werden, weshalb das Verfahren auch als molekulare Waage (*microbalance*) bezeichnet wird. Die Sensitivität der Waage reicht aus, um den Aptamer-IgE Komplex von freiem Aptamer zu unterscheiden.

Ein Beispiel für eine elektrochemische Signaltransduktion sind die sogenannten E-AB Sensoren gegen Kokain (89), Thrombin (90) oder PDGF, englisch: *platelet derived growth factor* (91). Die entsprechenden Aptamere sind mit dem 5'-Ende auf eine Oberfläche aufgebracht, die als Elektrode fungiert. Das 3'-Ende ist mit einem Redox-Reporter versehen, zum Beispiel Methylenblau. Durch die Ligandenbindung wird eine Umfaltung des Aptamers induziert, die den Redox-Reporter in räumlicher Nähe zur Elektrode fixiert und einen effizienteren Elektronentransfer ermöglicht. Die Ligandenbindung kann durch einen erhöhten Stromfluss detektiert werden.

Eine wichtige Weiterentwicklung der Aptamer-basierten Diagnostik ist die gleichzeitige Detektion von mehreren Zielmolekülen. Der bislang erfolgreichste Ansatz wurde von Gold *et al.* entwickelt (92,93). Durch einen aptamerbasierten Proteom-*array* konnten 813 Proteine gleichzeitig aus einer Blutprobe nachgewiesen werden. Die verwendeten Aptamere bestanden aus modifizierten Desoxynukleotiden. Der *array* wurde an Blutproben von Patienten mit Lungenkrebs oder chronischem Nierenversagen getestet. Die aptamerbasierte Proteom-Analyse lieferte für diese Krankheiten wertvolle Biomarker.

### 2.3.3 Therapie

Aptamere können auch in der therapeutischen Anwendung ähnlich wie monoklonale Antikörper eingesetzt werden. Aptamere haben allerdings einige Vorteile gegenüber Antikörpern (72). Durch die *in vitro* Synthese können Aptamere in großem Maßstab reproduzierbar und ohne biologische Kontaminationen hergestellt werden. Dabei ist die Produktion billiger und ohne den Einsatz von Tiermodellen möglich. Sie sind kleiner als Antikörper und können daher besser in biologische Kompartimente aufgenommen werden. Außerdem besitzen sie eine geringere Immunogenität. Gegenüber anderen RNA-basierten Therapeutika wie miRNAs können Aptamere gegen intra- und extrazelluläre Ziele entwickelt werden. Gerade extrazelluläre Ziele sind attraktiv, da Aptamere dann

nicht die Zellwand überwinden müssen. Aptamere als Therapeutika in klinischen Studien sind gegen Augen- und hämatologische Krankheiten, sowie gegen Krebs und virale Krankheiten gerichtet (94,95). Wichtig für ein erfolgreiches Aptamer sind vor allem eine hohe Affinität und Spezifität zum Zielmolekül, sowie eine lange Halbwertszeit im gewünschten biologischen Kompartiment.

Aptamere gegen eine Vielzahl von Zielproteinen von klinischem Interesse sind bereits beschrieben, bis jetzt hat allerdings nur ein einziges Aptamer Marktreife erlangt. Es handelt sich um ein modifiziertes Aptamer der Firma Eyetech/Pfizer, das den vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor VEGF bindet und zur Behandlung von altersbedingter Makuladegeneration (AMD) eingesetzt wird (96). Es verhindert die Interaktion von VEGF mit seinen Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 mit einer Inhibitionskonstante  $IC_{50}$  von 49 pM (97). Es verlangsamt den AMD-bedingten Sehverlust, der durch die anomale Bildung von Blutgefäßen eintritt. Dieses Aptamer wird *intravitreal* verabreicht und ist damit geringerer Degradation ausgesetzt als im Blut. Es besteht aus 2'-Fluoro-Pyrimidinen und 2'-OMe-Purinen, zusätzlich ist das 3'-Ende mit einem invertierten Nukleotid vor 3'-Exonuklease-Abbau geschützt. Das Aptamer ist mit 40 kDa PEG konjugiert, um die Verteilung im Gewebe zu verlangsamen.

Weitere Aptamere befinden sich in klinischen Phase II Versuchen. Die REG1 duale Aptamer-Therapie der Firma Regado Biosciences richtet sich gegen das akute Koronarsyndrom (98). Das Aptamer RB006 bindet den Coagulationsfaktor IXa, das zweite Aptamer RB007 wirkt als Antidot. Es bindet an RB006 und hebt dessen Wirkung auf. Aptamere können ebenfalls als zelltypspezifische Transportvehikel für andere Therapeutika verwendet werden etwa für siRNA (99,100), Enzyme (101) oder Krebsmedikamente (102,103). Das Protein PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) beispielsweise ist ein Oberflächenmarker von Prostatakrebszellen, der konstitutiv internalisiert wird (104). Das Aptamer A10 bindet PSMA mit nanomolarem  $IC_{50}$  Wert (105). Über die Bindung an A10 konnte das Krebsmedikament Doxorubicin, das Nukleinsäuren bindet, direkt in Krebszellen transportiert werden (106). Nachdem die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten von RNA-Aptameren beschrieben wurden, soll im nächsten Abschnitt die Zielstruktur der *in vitro* Selektion dieser Arbeit vorgestellt werden, die für den bakteriellen Zellwandaufbau verantwortlichen Penicillin-Bindeproteine (PBP).

## 2.4 Zielstruktur der *in vitro* Selektion

Die bakterielle Zellwand ist die Zielstruktur, gegen die über die Hälfte aller zugelassener Antibiotika gerichtet ist (107), die  $\beta$ -Lactame. Da allerdings zu jedem neu zugelassenen Antibiotikum bereits eine bakterielle Resistenz beschrieben wurde, gibt es einen ständigen Bedarf an neuen Antibiotika-Klassen (108). Diese Arbeit liefert eine Konzeptstudie zur Inhibition von bakteriellen

Resistenzfaktoren durch RNA-Aptamere. Im Folgenden werden die Zellwandsynthese und bakterielle Resistenzen sowie die Zielproteine für die *in vitro* Selektion vorgestellt.

### 2.4.1 Die Zellwand und PBP

Die Zellwand bietet als Zielstruktur zwei Vorteile (109): Erstens ist sie eine rein bakterielle Struktur, sodass Wirkstoffe nur geringe Nebenwirkungen auf den humanen Organismus haben. Zweitens müssen Wirkstoffe nicht in die Erregerzellen eindringen, sondern wirken extrazellulär. Den Zellwandaufbau zu inhibieren ist für Bakterien tödlich, da sie durch ihre Zellwand dem hohen intrazellulären osmotischen Druck standhalten. Die Zellwand besteht aus Peptidoglycan, gebildet durch polymere Glycanstränge, die über Oligopeptide miteinander quervernetzt sind (110). Der Zellwandaufbau wird durch die Penicillin-Bindeproteine (PBP) katalysiert. Sie polymerisieren die Glycansstränge als Transglycosylasen und vermitteln als Transpeptidasen die Vernetzung der Stränge zu einer dreidimensionalen Matrix. Die Transpeptidase ist die Penicillin-Bindedomäne (PBD), die, wie der Name schon sagt, der Angriffspunkt von Penicillin und anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist.

PBPs kommen in diversen Formen in Bakterien vor und jede Art hat ihr individuelles Set, bestehend aus mehreren PBPs (111). Die PBPs werden nach ihrer Größe in hochmolekular und niedermolekular unterteilt. Allen gemeinsam ist die konservierte PBD. Hochmolekulare PBPs besitzen daneben noch eine Transglycosylase-Domäne, sowie einen Transmembrananker. Die niedermolekularen PBPs haben keine Transglycosylasen und sind nicht Membran-gebunden, sondern mit dem Peptidoglycan assoziiert. Die PBD hat eine Größe von etwa 30 kDa und besteht ihrerseits aus zwei Subdomänen. Das aktive Zentrum liegt an der Kontaktstelle der beiden Domänen und wird von neun konservierten Aminosäureresten gebildet (112). Das aktive Zentrum kann als doppeltes Lysin-Serin System betrachtet werden, in dem Acylierung und Deacylierung stattfinden.

Die PBD kann statt einer Trans- auch eine Endopeptidase sein, ein Enzym zur Spaltung von Peptidbrücken. Endopeptidasen sind wichtig für morphologische Veränderungen der Zelle, beispielsweise während der Teilung (113). Andere PBD dienen als Sensordomänen von  $\beta$ -Lactam-Rezeptoren, die die Expression von Resistenzfaktoren induzieren (114). Zu den PBD gehören auch die  $\beta$ -Lactamasen, die paralog zu Transpeptidasen sind (115).  $\beta$ -Lactamasen sind zwar strukturell verwandt, werden aber nicht von  $\beta$ -Lactamen inhibiert, sondern neutralisieren sie.

### 2.4.2 Bakterielle Resistenzfaktoren

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ahmen das natürliche Substrat R-D-Ala-D-Ala des Oligopeptids nach, bilden aber einen langlebigen Enzym-Acyl-Komplex, der das Enzym blockiert. Gegen die Vielzahl von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika haben Bakterien eine ebenso viele Resistenzfaktoren entwickelt, um in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactamen weiterhin Zellwandsynthese betreiben zu können (115). Die

Resistenzfaktoren beschränken sich allerdings auf wenige Mechanismen: Bei Gram-negativen Bakterien werden  $\beta$ -Lactame aktiv über die äußere Membran exportiert, die für  $\beta$ -Lactame nur eingeschränkt permeabel ist. Ein weiterer Mechanismus Gram-positiver und -negativer Bakterien ist der aktive Abbau des Antibiotikums durch  $\beta$ -Lactamasen. Darüber hinaus haben viele Bakterien Transpeptidasen entwickelt, die eine sehr geringe Affinität für  $\beta$ -Lactame besitzen und somit unempfindlich für das Antibiotikum sind. Die Resistenzmechanismen lassen sich mit vier Schlagwörtern zusammenfassen: Aufnahme, Affinität, Abbau und Export.

### 2.4.3 Erreger und Zielproteine

Die Klasse A  $\beta$ -Lactamasen wurden bereits früh in der Geschichte der Antibiotikaresistenzen entdeckt (116). Vertreter dieser Klasse wurden als erstes als ESBL (*extended spectrum beta lactamases*) eingestuft (117). Sie treten vornehmlich in Gram-negativen Bakterien auf. Die erste beschriebene Klasse A  $\beta$ -Lactamase war TEM1, benannt nach dem Patienten, aus dem der resistente Stamm isoliert wurde (118). TEM1 gehört zu den am weitest verbreiteten  $\beta$ -Lactamasen und wird auch als Ampicillin-Resistenzmarker auf Plasmiden in der Molekularbiologie eingesetzt. Es ist der evolutionäre Ausgangspunkt von mittlerweile über 200 beschriebenen Varianten (119). TEM1 ist das erste Zielprotein der Arbeit, da es weit verbreitet ist und eine der wichtigsten Gruppen bakterieller Resistenzfaktoren repräsentiert.

Der multiresistente Erreger *Staphylococcus aureus* besitzt mehrere Resistenzmechanismen. Zunächst traten Penicillin-resistente Stämme auf, die  $\beta$ -Lactamasen besaßen. Methicillin wurde als neues Antibiotikum eingeführt, das nicht durch  $\beta$ -Lactamasen gespalten wird. Kurze Zeit später wurde der erste Methicillin-resistente Stamm isoliert (120). Diese Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme (MRSA) sind extrem gefährlich, da sie praktisch gegen alle  $\beta$ -Lactame resistent sind und es kaum alternative Behandlungen gibt. Neben den vier konstitutiven PBP exprimieren MRSA Stämme ein fünftes PBP (PBP2A) ausschließlich in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactamen (121). PBP2A bindet  $\beta$ -Lactame mit sehr schwacher Affinität und kann nicht durch  $\beta$ -Lactame blockiert werden (122,123). Die  $\beta$ -Lactam-Sensordomäne MecRI vermittelt diese Resistenzantwort der Zelle und ist ein Zielprotein dieser Arbeit (114).

In Enterokokken übernimmt das hochmolekulare PBP5 die Transpeptidasefunktion in Anwesenheit von  $\beta$ -Lactamen. PBP5 aus *Enterococcus faecium* gehört zur gleichen Untergruppe wie PBP2A aus *S. aureus* (124) und zeichnet sich durch eine ähnlich geringe Bindungsaffinität zu  $\beta$ -Lactamen aus (125). Außerdem wurden Stämme mit  $\beta$ -Lactamasen und vancomycinresistente Stämme (VRE) isoliert, die bei Krankenhausinfektion eine immer größere Rolle spielen (126). In dieser Arbeit wird eine Selektion gegen eine der noch seltenen  $\beta$ -Lactamasen aus *E. faecium* durchgeführt.

Pneumokokkenstämme, die  $\beta$ -Lactamasen exprimieren oder auf zusätzliche PBP mit niedriger Affinität zurückgreifen können, wurden noch nicht isoliert. Dafür exprimieren sie konstitutiv mehrere Varianten ihrer PBP, die schwach affin für  $\beta$ -Lactame sind (127). Die drei PBP2b, PBP2x und PBP1a in *Streptococcus pneumoniae*, die in resistenten Stämmen variiert auftreten, sind auf Mosaikgenen kodiert (128). Mosaikgene entstehen durch Rekombination mit verschiedenen Allelen einer Spezies oder orthologen Genen verwandter Spezies. Neben horizontalem Gentransfer spielen allerdings auch Punktmutationen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung niedrigaffiner PBP (129). PBP2x ist ein weiteres Zielprotein.

Eine neue  $\beta$ -Lactamase ist die Neu-Dehli-metallo- $\beta$ -Lactamase NDM1 aus *Klebsiella pneumoniae* (130). Die Metallo- $\beta$ -Lactamasen (MBL) mit prosthetischen Zink-Ionen sind in der molekularen Klasse B zusammengefasst. NDM1 spaltet Carbapeneme, die lange als letzte Breitband-Antibiotika gegen Gram-negative Bakterien zurückgehalten wurden. Nachdem Carbapeneme allerdings in den letzten Jahren verstärkt gegen ESBL-tragende Enterobakterien eingesetzt worden waren, erhöhte sich der Selektionsdruck, was zur Entwicklung von Carbapenemasen wie NDM1, aber auch VIM1 oder IMP1 führte (131). Das plasmidständige Resistenzgen *bla<sub>NDM1</sub>* verbreitet sich schnell durch horizontalen Gentransfer in *Enterobacteriaceae* und anderen Gram-negativen Familien (132). Der geographische Ursprung von NDM1 liegt auf dem indischen Subkontinent, mittlerweile wurden Infektionen mit NDM1-Stämmen auf der ganzen Welt berichtet (133), auch in Deutschland (134,135). Nach einem aktuellen Expertenbericht hat die Entwicklung von Carbapenemase-Inhibitoren höchste Priorität um die zukünftige Antibiotika-Versorgung zu gewährleisten (108,133).

## 2.5 Zielsetzung

Durch *in vitro* Selektion sollen RNA-Aptamere entwickelt werden, die an bakterielle Resistenzfaktoren der  $\beta$ -Lactamase- und PBP-Familie binden und diese inhibieren. Im ständigen Wechsel neuer Antibiotika-Therapien und darauf folgender evolutiver Entwicklung einer Resistenz bietet die RNA-Aptamer-Selektion einen Vorteil zu anderen Stoffgruppen: Den evolvierenden Krankheitserregern wird durch die *in vitro* Selektion eine ebenso evolutive Antibiotika-Entwicklung entgegengesetzt. Diese Arbeit soll eine Grundlage für Aptamere als RNA-basierte Antibiotika schaffen.



### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird die *in vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen bakterielle  $\beta$ -Lactam-Resistenzfaktoren vorgestellt. Dieser Abschnitt beschreibt die Herstellung des RNA-Pools und die Präparation der Resistenzfaktoren, namentlich Penicillinbindepoteine (PBP). Es werden die Strategien und Verläufe der Selektionen und deren Auswertungen gezeigt. Schließlich werden die Eigenschaften einzelner Aptamere charakterisiert.

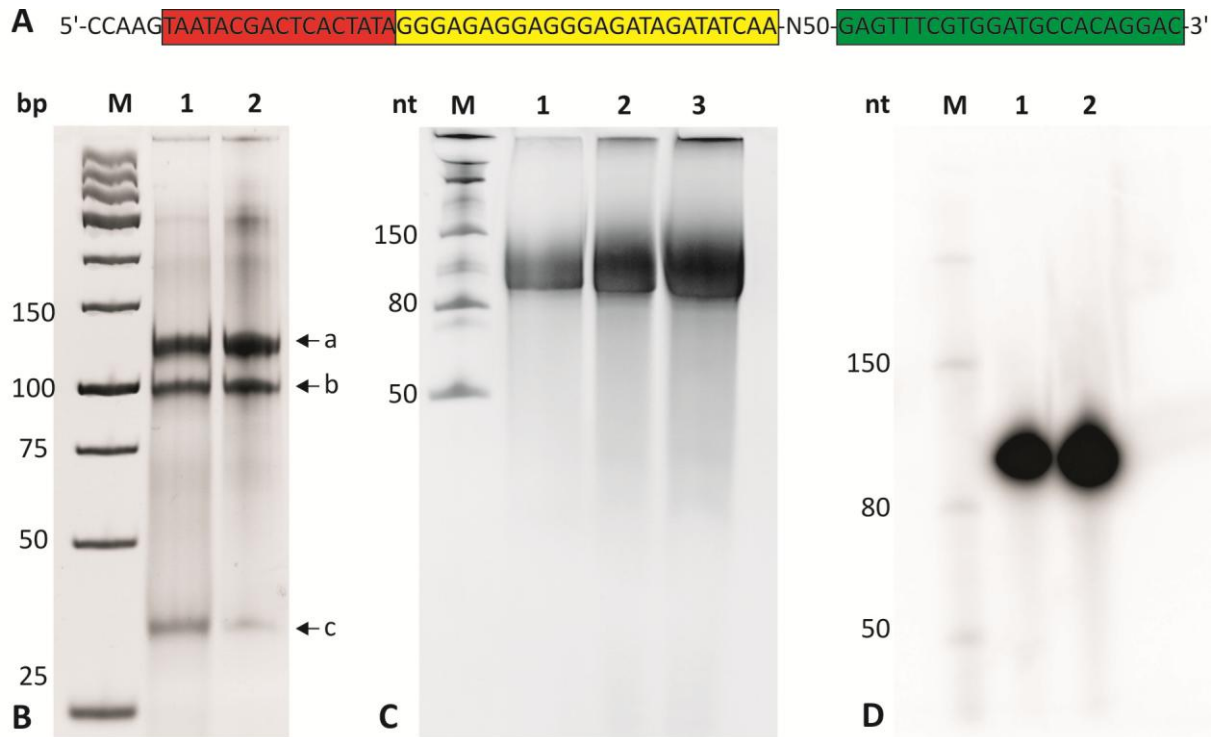
Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit natürlichen Purin-Aptameren und ihrem Einsatz als synthetische Genexpressionsschalter in Labororganismen. Riboswitches aus exotischen oder humanpathogenen Bakterienarten werden charakterisiert und ergänzen den molekularen Baukasten als Bausteine zur Genregulation.

#### 3.1 Erste *in vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen TEM1

##### 3.1.1 Der initiale Pool

Die *in vitro* Selektion basiert auf einer Bibliothek von zufälligen RNA-Sequenzen, auch randomisierte Sequenzen oder RNA-Pool genannt. In dieser Arbeit wird ein 50 Nukleotide langer randomisierter Pool (N50) verwendet, dessen Sequenz in Abbildung 5A dargestellt ist. Der initiale Pool wird zunächst als doppelsträngige DNA durch PCR aus drei DNA-Oligonukleotiden erstellt: Das *template*-Oligonukleotid (NC-Pool) beinhaltet den randomisierten Bereich, das Vorwärts-Oligonukleotid (NC-For) fügt den T7-Promotor und die 5'konstante Region an und das Rückwärts-Oligonukleotid (NC-Rev) kodiert für die 3' konstante Region. Vom *template*-Oligonukleotid wurde 1 nmol in die PCR eingesetzt, was in 3 nmol dsDNA-Pool resultierte. Für die Transkription wurden 2 nmol des dsDNA-Pools als *template* eingesetzt. Ein kleiner paralleler Transkriptionsansatz wurde mit  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{UTP}$  als radioaktive Markierung versetzt. Die Ausbeute der Transkription betrug 23 nmol, die der radioaktiven Transkription 0,7 nmol. Die Entstehungsstufen des initialen Pools sind in Abbildung 5B bis D dargestellt

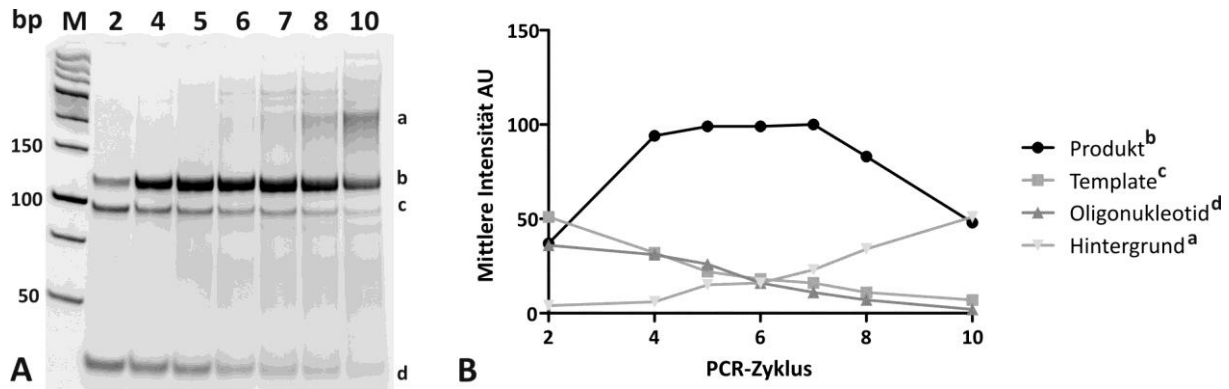
## Ergebnisse



**Abbildung 5** Schematische Darstellung des dsDNA-Pools und Verlauf der Poolherstellung. **A** Poolsequenz Rot: T7 Promotorregion, Gelb: 5'konstante Region, randomisierter N50-Bereich, Grün: 3'konstante Region. **B** PCR-Produkt vor (1) und nach (2) Aufarbeitung, M *ultra low range II* DNA-Leiter (Peqlab); **C** Testtranskription, in den Banden 1, 2 und 3 sind respektive 2 µl, 4 µl und 6 µl Transkriptionsprodukt aufgetragen, M *low range* RNA Leiter (NEB); **D** radioaktive Testtranskription, 1 µl und 2 µl Transkriptionsansatz aufgetragen, M *low range* RNA Leiter (NEB) radioaktiv markiert mit  $^{32}\text{P}$ -γATP.

In Abbildung 5 sind Kontrollgele der DNA- und RNA-Pools gezeigt. Die Pool-PCR in B zeigt drei Banden im Gel vor einem leichten Schmier. Die am höchsten laufende Bande a entspricht dem dsDNA-Pool. Kurz darunter liegt Bande b bei etwa 100 bp, die wahrscheinlich dem Template-Oligonukleotid entspricht. Zwischen 25 und der 50 bp befindet sich Bande c, die der Größe von NC-For entspricht. Das deutlich kürzere NC-Rev ist bereits aus dem Gel gelaufen. Es wurde nicht das gesamte Template in der Reaktion zu dsDNA umgesetzt. Auf diese Eigenschaft der Pool-PCR wird in der nächsten Abbildung noch näher eingegangen. Die Abbildung 5C zeigt den RNA-Pool, es ist nur marginale RNA-Degradation zu erkennen, der Pool war intakt. In Abbildung 5D ist radioaktiv markierter RNA-Pool in einer denaturierenden PAGE dargestellt, auch hier sind keine Degradationsspuren sichtbar.

## Ergebnisse



**Abbildung 6** Initiale Pool-PCR: A native PAGE des PCR-Verlaufs. Angegeben ist die PCR-Zyklenzahl, nach der die Probe entnommen wurde. B Auswertung der PAGE: mittlere Intensitäten der charakteristischen Banden nach angegebener Zyklenzahl. Die Quantifizierung erfolgte über ImageJ (136).

Die PCR in Abbildung 6 zeigt den Verlauf der initialen Pool-PCR. Eine charakteristische Eigenschaft dieser PCR ist die Zunahme an unspezifischem Produkt mit steigender Zyklenzahl, bei gleichzeitiger Abnahme des gewünschten Produkts. Da dieser Effekt bei PCR-Reaktionen mit einer definierten Template-Sequenz in den meisten Fällen nicht auftritt, liegt die Bildung des unspezifischen Produktes an den Zufallssequenzen N50. Sinkt die Oligonukleotidkonzentration im Laufe der PCR zu sehr ab, hybridisieren die Zufallssequenzen untereinander und unspezifische Produkte entstehen. Dieser Effekt wurde bereits beschrieben (137). Die Wahl der Zyklenzahl für die initiale PCR ist also ein Kompromiss zwischen Produkt-, freier Template- und unspezifischer Produktkonzentration. Die Zyklenzahl wurde schließlich auf sechs festgelegt.

### 3.1.2 Vorbereitung des Zielproteins TEM1

Das Zielprotein der ersten Selektion war die  $\beta$ -Lactamase TEM1 aus *E. coli*, die am weitesten verbreitete  $\beta$ -Lactamase (138). Die erste Charge des Proteins wurde dankenswerterweise vom Lehrstuhl Mikrobiologie der Universität Erlangen zur Verfügung gestellt. TEM1 wurde in *E. coli* überexprimiert und nach osmotischem Schock aus der periplasmatischen Fraktion aufgereinigt. Das Protein wurde vor Gebrauch durch SDS-PAGE und Aktivitätstest überprüft (Abbildung 7).

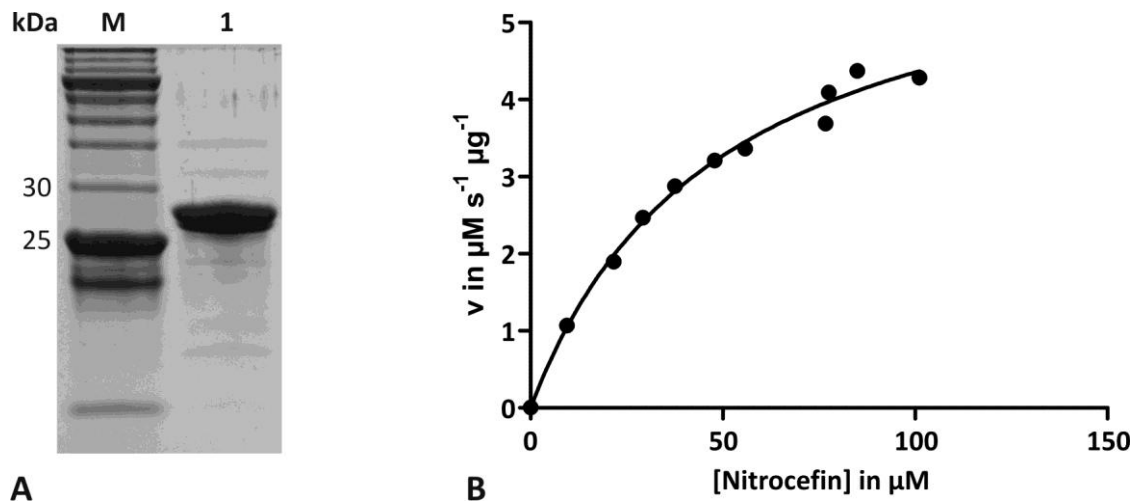


Abbildung 7 A SDS-PAGE von TEM1, Probe aus Erlangen. Größenstandard: *prestained Protein Marker* (NEB). B Michaelis-Menten Kinetik von TEM1, der Aktivitätstest wurde mit dem chromogenen  $\beta$ -Lactam Nitrocefin als Substrat durchgeführt. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  mit der Einheit  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  in Abhängigkeit der Nitrocefinkonzentration in  $\mu\text{M}$ . Die Daten wurden durch nichtlineare Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet.

Abbildung 7A zeigt eine SDS-PAGE zur Kontrolle des TEM1-Proteins aus Erlangen. Die Probe weist nur geringe Spuren von Verunreinigungen auf, die Reinheit wurde für die Selektion als ausreichend erachtet. Die starke Bande zwischen 25 kDa und 30 kDa entspricht TEM1. In Abbildung 7B ist eine Michaelis-Menten Kinetik von TEM1 gezeigt. Als Substrat wurde das chromogene  $\beta$ -Lactam Nitrocefin verwendet. Die Abbildung zeigt die Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Auswertung der Kinetik ergab eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  von  $6,5 \pm 0,4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  und eine Michaelis-Menten Konstante  $K_M$  von  $49 \pm 6 \mu\text{M}$ . Diese Werte liegen im Bereich der bisher veröffentlichten Werte(139).

Als Selektionsmethode wurde in dieser SELEX die Affinitätschromatographie verwendet. Das Säulenmaterial war CNBr-aktivierte Sepharose, an die das Zielprotein TEM1 gekoppelt wurde. Die Kopplung erfolgte kovalent über positiv geladene Seitenketten auf der Oberfläche von TEM1. Die Kopplungseffizienz wurde bestimmt, indem die Proteinkonzentration im Überstand nach Kopplungsreaktion durch Bradford-Test gemessen wurde. Im Überstand konnten nur geringe Mengen TEM1 nachgewiesen werden. Aus der Proteinkonzentration des Überstandes konnte man zurückrechnen, dass 80% der eingesetzten Menge an TEM1 an die Säule gebunden hat. Die Konzentration der gekoppelten TEM1 betrug  $80 \mu\text{g/ml}$  Sepharose-Suspension. Die Aktivitäten der Sepharose-gekoppelten- und freien TEM1 sind in Tabelle 2 verglichen. Die kinetischen Konstanten der gekoppelten TEM1 sind deutlich schlechter als die der freien. Dennoch wurde die Selektion mit der Sepharose-gekoppelten TEM1 durchgeführt, da Aktivität nachgewiesen wurde.

Tabelle 2 TEM1 Aktivität in freiem und gekoppeltem Zustand.

	$K_M$ in $\mu\text{M}$	$V_{\max}$ in $\mu\text{M s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$	$V_{\max}/K_M$ in $\text{s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$
<b>Freie TEM1</b>	49±6	6,5±0,4	0,13
<b>Gekoppelte TEM1</b>	317±39	0,6±0,1	0,002

$K_M$  Michaelis-Menten Konstante,  $V_{\max}$  maximale Reaktionsgeschwindigkeit.  $V_{\max}/K_M$  ist die katalytische Effizienz von TEM1

### 3.1.3 Die *in vitro* Selektion

Im Folgenden soll zunächst die Strategie der Selektion erklärt werden. Bis auf die erste Runde wurde der radioaktiv markierte RNA-Pool zunächst über eine Vorsäule gegeben. Die Vorsäule bestand nur aus inaktivierter Sepharose ohne TEM1. Dadurch sollte die Anreicherung unspezifisch bindender RNA-Spezies unterbunden werden. Der erste Durchfluss der Vorsäule, genannt Waschfraktion 1 (W1), enthielt den größten Teil des RNA-Pools. W1 wurde dann auf die Hauptsäule geladen.

Der zentrale Schritt der Selektion war die Hauptsäule, in der RNA-Pool und TEM1 miteinander inkubiert wurden. Abbildung 8 zeigt beispielhaft das Profil einer Hauptsäule. Entsprechend der RNA-Menge in W1 wurde entschieden, wie viel TEM1 in die Hauptsäule eingesetzt wurde. Zunächst wurde ein RNA/Proteinverhältnis von 0,5 angestrebt, bei späteren Runden wurde das RNA/Protein-Verhältnis variiert, um die Stringenz der Selektion zu beeinflussen. Das Säulenvolumen betrug 1 ml, eine Waschfraktion 2 ml und eine Elutionsfraktion 0,5 ml. Es wurde fünfmal gewaschen und sechsmal eluiert. Die Elution von der Säule erfolgte durch Denaturierung mit 8 M Harnstoff in Selektionspuffer.

Die eluierte RNA aus der Hauptsäule wurde gefällt und revers transkribiert. Ein Drittel der cDNA wurde für eine Test-PCR zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl verwendet, ein weiteres Drittel für die eigentliche PCR, die restliche cDNA wurde bei -20°C gelagert. Durch Transkription des dsDNA-Pools wurde ein neuer RNA-Pool erhalten und in die nächste Selektionsrunde eingesetzt.

## Ergebnisse

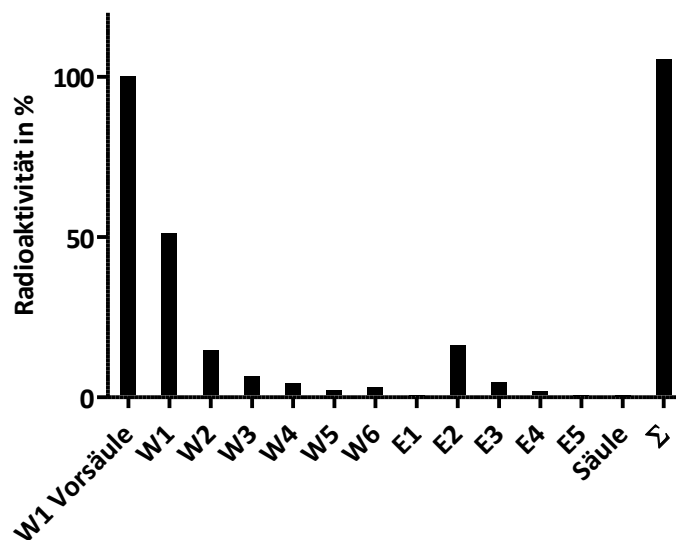


Abbildung 8 Hauptsäule 7.5 als Beispiel für eine Affinitätschromatographie. Radioaktivitäten sind auf die eingesetzte Gesamtaktivität (W1 Vorsäule) normiert. W1-W6 bezeichnet die Aktivität der Waschfraktionen, E1-E5 die Aktivität der Elutionsfraktionen. Säule ist die Restaktivität, die nach Elution im Säulenmaterial nachweisbar war.  $\Sigma$  gesamt ist die Summe aller Aktivitäten von W1 bis Säule als interne Kontrolle.

Die *in vitro* Selektion wurde über insgesamt zehn Runden verfolgt, einige Runden wurden zum Teil mehrfach wiederholt. Dabei wurden die Parameter der Selektion variiert. Dazu gehörten das RNA/Protein-Verhältnis, die Anzahl der Wasch- und Elutionsfraktionen, das Säulenvolumen und letztlich sogar die Pufferbedingungen. Die Hauptsäule 7.5 (Abbildung 8) zeigt exemplarisch das Profil einer Selektionsrunde. Die erste Waschfraktion enthielt nach sieben Selektionsrunden nur noch 50% der Gesamtaktivität, in früheren Runden befanden sich noch 80% bis 90% in der ersten Waschfraktion. Die Aktivitäten der weiteren Waschfraktionen nahmen dann in einem exponentiellen Verlauf ab. Die erste Elutionsfraktion E1 zeigte keine erhöhte Aktivität, da die Elutionsfraktionen kleiner als das Säulenvolumen waren. E1 bestand somit noch aus dem Rest der letzten Waschfraktion. Erst mit der zweiten Fraktion E2 begann die eigentliche Elution. Diese fiel mit 16% deutlich höher aus als in den vorherigen Runden. Auf der Säule war nach der Elution nur noch eine geringe Radioaktivität nachweisbar. Eine interne Kontrolle der Auswertung war die Aufsummierung aller gemessenen Radioaktivitäten. Bei korrekter Auswertung näherte sich die Summe der Aktivitäten wieder dem Wert von Vorsäule W1 an.

In Abbildung 9 und Tabelle 3 ist der Verlauf der Selektion anhand von Eckdaten beschrieben. Es wird dargestellt, wie viel RNA-Pool eingesetzt wurde und wie welcher Anteil der gesamten Radioaktivität aus Vor- und Hauptsäule eluiert wurde. Weiterhin sind die Zyklenzahlen der PCR nach jeder Runde angegeben. Im Laufe der Selektion wurden verschiedene Säulenpuffer verwendet. Die Kaliumphosphatkonzentration wurde wie angegeben variiert. Eine Veränderung der Pufferkonzentration steigert im Allgemeinen die Stringenz der Selektion. Dabei können sowohl

## Ergebnisse

höhere als auch niedrigere Pufferkonzentrationen die Stringenz steigern. Eine Tabelle mit den Eckdaten aller durchgeführten Runden findet sich außerdem im Anhang.

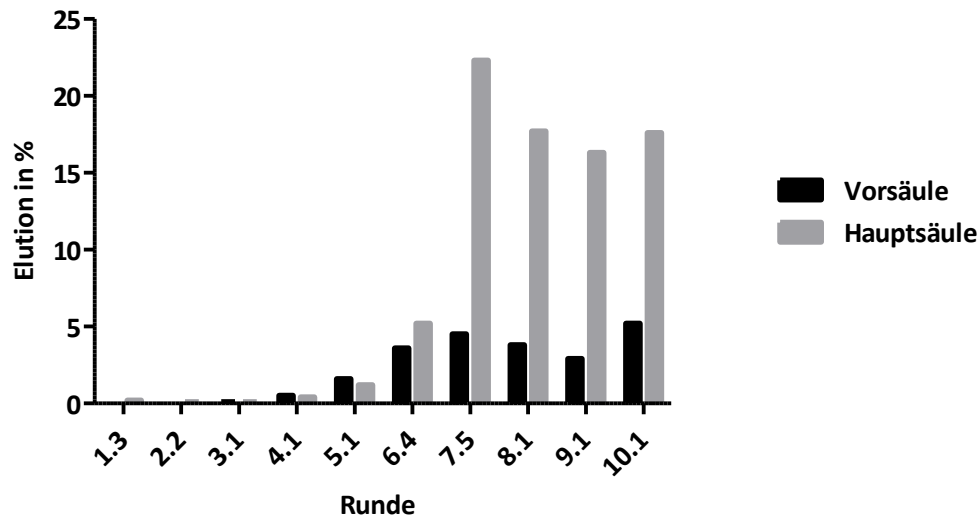


Abbildung 9 Selektionsverlauf: Anteil eluierter RNA in Vor- und Hauptsäule in Abhängigkeit von der Runde. Runde 1.3 ist zu lesen als 3. Wiederholung der ersten Runde. Die RNA-Pools waren sämtlich radioaktiv markiert, die Bezeichnung Elution in % bezeichnet die Radioaktivität aller Elutionsfraktionen im Verhältnis zur Radioaktivität des eingesetzten RNA-Pools.

Tabelle 3 Selektionsverlauf.

Runde	RNA Pool	Vorsäule		Hauptsäule		PCR Zyklen	Puffer [KPosphat]/ M
	nmol	W1/ nmol	% Elution	TEM-1/nmol	% Elution		
1.3	2,3	-	-	5,0	0,2	12	0,1
2.2	1,8	1,2	0,0	2,5	0,1	12	0,1
3.1	0,7	0,7	0,1	1,3	0,1	12	0,1
4.1	0,2	0,2	0,5	0,3	0,4	12	0,1
5.1	1,0	0,5	1,6	1,6	1,2	12	0,1
6.4	0,4	0,3	3,6	0,8	5,2	6	0,2
7.5	0,9	0,4	4,5	2,9	22,3	9	0,1
8.1	4,3	2,8	3,8	3,8	17,7	8	0,1
9.1	0,8	0,5	2,9	1,9	16,3	7	0,1
10.1	1,6	1,2	5,2	1,9	17,6	7	0,05

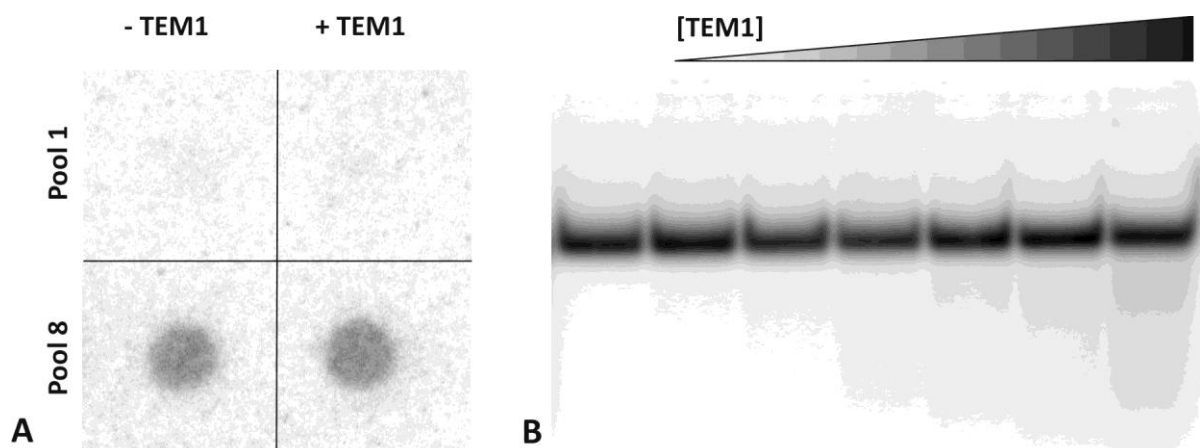
Die erste Spalte bezeichnet die jeweilige Selektionsrunde, die zweite Spalte die eingesetzte Menge RNA in nmol. W1 bezeichnet die Menge eingesetzter RNA in die Hauptsäule in nmol. %Elution ist die Summe der Radioaktivitäten der Elutionsfraktionen bezogen auf die Gesamtradioaktivität. Die Menge von TEM1 in der Hauptsäule ist in nmol angegeben. PCR Zyklen ist die optimale Zahl der PCR Zyklen nach reverser Transkription. Die letzte Spalte gibt die Konzentration von Kaliumphosphat im Selektionspuffer an.

Die Selektion verlief in den Runden eins bis vier ohne Veränderung der Elutionswerte. Die Menge eingesetzter RNA ging bis Runde vier zurück, dementsprechend wurde auch weniger TEM1

eingesetzt. Die Zyklenzahl der PCR blieb unverändert. In Runde fünf und sechs stieg die Elution der Vor- und der Hauptsäule leicht an. Runde sieben zeigt eine starke Zunahme der Elution aus der Hauptsäule bei etwa unveränderter Elution von der Vorsäule. Ab Runde 7 sind in der PCR weniger Zyklen zur Amplifikation des Pools notwendig, was für eine höhere Template-Konzentration zu Beginn der PCR und damit für eine höhere RNA-Konzentration in der Elution spricht. Die Runden acht bis zehn wurden mehrmals durchgeführt, dabei wurden Stringenzkriterien wie RNA/Proteinverhältnis und Pufferkonzentration variiert. Die Wiederholungen führten nicht zu einem Fortschritt der Selektion, das Verhältnis von Elution aus Hauptsäule zu Vorsäule stieg nicht weiter signifikant an. Die Selektion wurde nach 10 Runden abgeschlossen, da die Anreicherung der RNA-Pools nicht mehr gesteigert werden konnte.

### 3.1.4 Auswertung der Selektion

In der Affinitätschromatographie zeigten die RNA-Pools ab Runde sieben eine hohe Elution von der Hauptsäule mit TEM1. Es wurde vermutet, dass TEM1-bindende RNA-Sequenzen angereichert wurden. Bevor Einzelsequenzen der Pools charakterisiert werden sollten, wurde die Bindung des angereicherten Pools an TEM1 durch alternative Methoden getestet. Es wurden Nitrozellulose-Filterretentions- und Geverzögerungsexperimente (EMSA) mit einem radioaktivmarkierten RNA-Pool aus Runde 8 und einem naivem Pool durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** A Filterretention radioaktivmarkierter RNA-Pools aus Runde 1 und 8 mit (+) und ohne (-) TEM1. B EMSA: radioaktivmarkierte Pool 8 RNA mit steigender TEM1 Konzentration in nativer PAGE. Es wurden Konzentrationen von 0,3 µM bis 15 µM eingesetzt. Die Rampe mit Farbverlauf deutet den Konzentrationsanstieg an. In der ersten Spur von links wurde kein TEM1 zugesetzt.

Im Filterretentionstest wurden radioaktiv markierte RNA-Pools mit TEM1 inkubiert und anschließend durch eine Nitrozellulose-Membran gefiltert. TEM1 sowie TEM1-RNA-Komplexe sollten an die Membran binden, freie RNA dagegen nicht. Die zurückgehaltene Radioaktivität auf der Membran wurde im Phosphorimager ausgelesen. Das Ergebnis der Filterretention ist in Abbildung 10A abgebildet. Der naive Pool aus Runde 1 wurde nicht an der Membran detektiert, der RNA-Pool aus

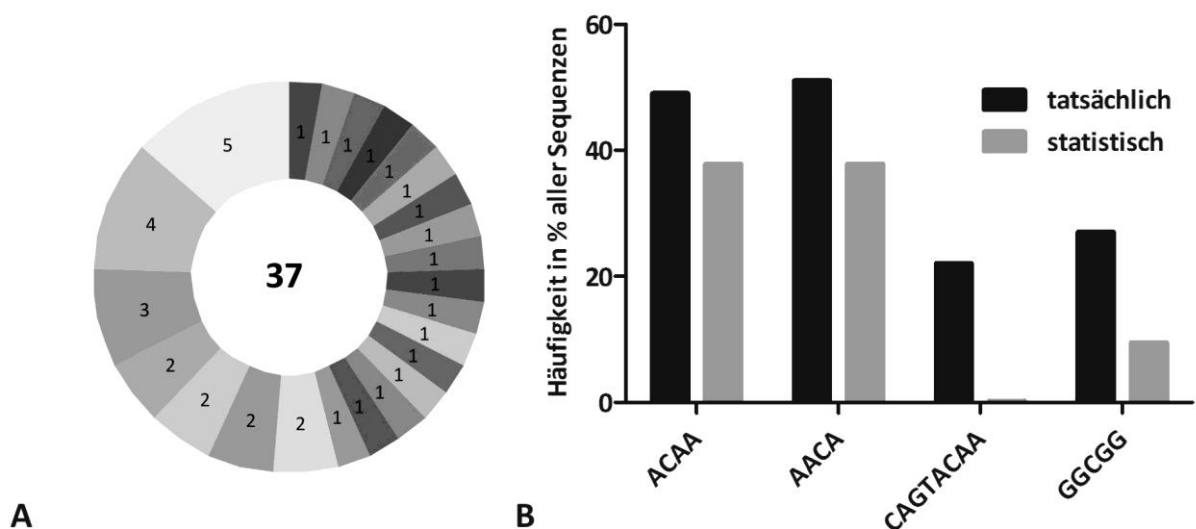


Runde 8 konnte nachgewiesen werden, jedoch unabhängig von TEM1. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, immer mit dem gleichen Ergebnis. Es konnte keine spezifische Wechselwirkung zwischen dem angereicherten RNA-Pool und TEM1 nachgewiesen werden.

Das Gelverzögerungsexperiment EMSA, ist eine weitere unabhängige Methode, um RNA-TEM1-Wechselwirkungen nachzuweisen. Radioaktiv markierte RNA wurde in mehreren Ansätzen mit steigenden Konzentrationen TEM1 inkubiert, danach wurde eine native PAGE durchgeführt. Das Gel wurde im Phosphorimager ausgelesen und ist in Abbildung 10B dargestellt. RNA-TEM1-Komplexe sollten gegenüber freier RNA verzögert laufen. Im Gel war jedoch keine Verzögerung zu erkennen. Auch durch EMSA konnte kein TEM1-RNA-Komplex nachgewiesen werden.

### 3.1.5 Charakterisierung der Einzelsequenzen

Die Untersuchung des angereicherten Pools durch Filterretention und EMSA ergab keine Hinweise auf TEM1-bindende RNA-Sequenzen und stand damit im Widerspruch zur Säulenchromatographie. Eine Analyse von Einzelsequenzen der angereicherten Pools 7.5 und 9.1 sollte zum Verständnis der widersprüchlichen Ergebnisse führen. Pool 7.5 wurde wegen der stärksten Elution, Pool 9.1 wegen dem besten Verhältnis von Haupt- zu Vorsäule ausgewählt. Die dsDNA-Pools 7.5 und 9.1 wurden in das Plasmid pJet kloniert, von jedem Pool wurden 20 Klone sequenziert.



**Abbildung 11:** Sequenzen aus Pool 7.5 und 9.1. A Häufigkeitsverteilung der 37 individuellen Sequenzen; B tatsächliche Häufigkeit von Sequenzmotiven in den Pools im Vergleich zur erwarteten statistischen Häufigkeit. Die statistische Häufigkeit  $h$  eines  $n$  Nukleotide langen Motivs in einer  $m$  Nukleotide langen Zufallssequenz wurde mit  $h = m/4^n$  berechnet.

Von 40 Klonen enthielten 37 einen vollständigen 50N-Bereich. Die Häufung identischer Klone ist in Abbildung 11A dargestellt. Etwa die Hälfte der Sequenzen trat einmal auf, vier Sequenzen traten doppelt auf. Jeweils eine Sequenz trat 3-, 4- und 5-mal auf. Der Pool zeigte eine Anreicherung, da mehrere Sequenzen häufig vertreten sind. Alle Sequenzen sind in Anhang 7.1 zusammengefasst. Die

## Ergebnisse

Sequenzen wurden auf wiederkehrende kurze Motive untersucht, dabei konnte ein Motiv identifiziert werden. In jeder fünften Sequenz wurde ein 8 nt langes Sequenzmotiv gefunden CAGTACAA, dessen Häufigkeit deutlich über der statistischen Wahrscheinlichkeit lag (Abbildung 11B). Die N50-Sequenzen die das Motiv beinhalten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 4:**N50-Sequenzen, die das CAGTACAA-Motiv enthalten.

Name	N50-Sequenz	h
7.11	CGGATCAGTACAAATCGAATGCTATGACCATGCACCTCTGCATTCAAGC	1
7.20	CAACATCTGGCGGTCCAACGGTAAGCACATGTGACAGTACAAATACATAGC	4
9.8	GACGGTTGGATATCATTTGGATCAAAATCTGAAAAGTACAAATATAGC	1
9.14	CCCGTGGATGATGGGTATACTCAGTATCAACGTAAAGTACAAATATAAGC	1
9.19	ATGTTTTCTACGGAGTTACCTGACGCTATCCTTAAAGTACAAAGTGATGC	1

Die Sequenzen sind nach Pool und Klon benannt (Pool7.Klon11); N50-Sequenzen mit Motiv in rot markiert; h Häufigkeit der Sequenz in den untersuchten Klonen.

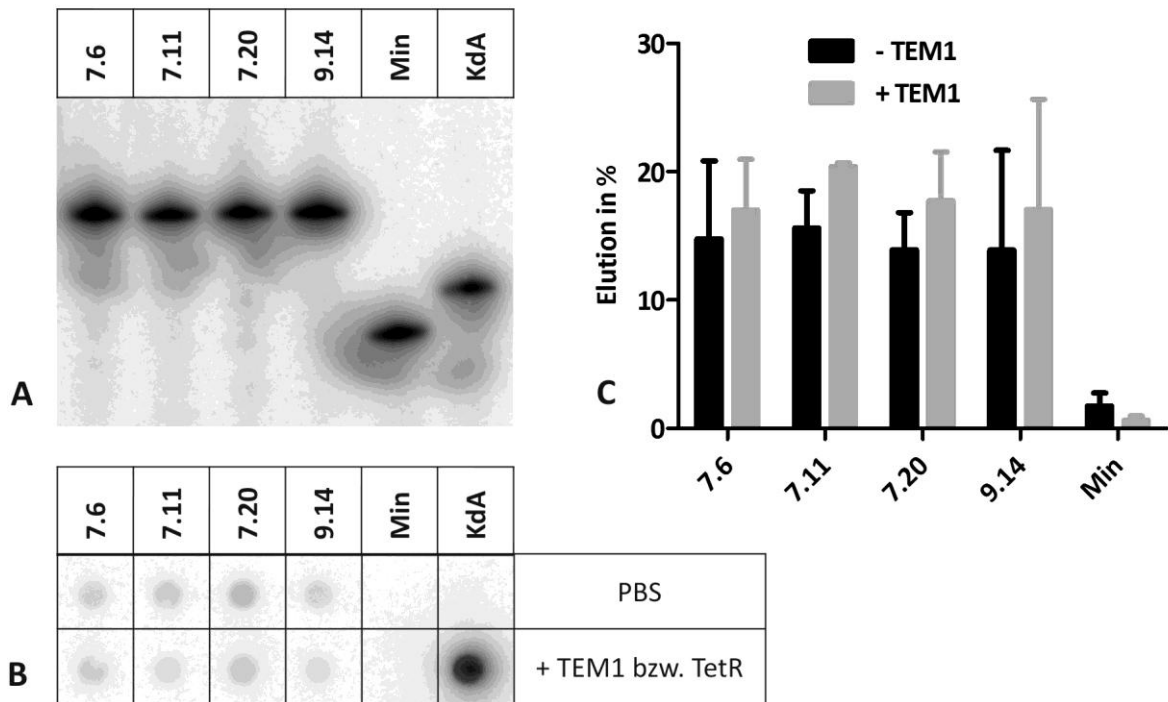
Es fällt auf, dass das Motiv immer im 3'-Bereich von N50 lag und nur einmal im 5'-Bereich. Als nächstes wurde untersucht, ob das Motiv in einer einheitlichen Sekundärstruktur eingebettet war. Dafür wurden an den Sequenzen computergestützte Faltungsanalysen mit den Programmen RNAfold (140) und RNashapes (141) durchgeführt (Abbildung 12). Das Motiv befand sich in jeder Sequenz in einer Stammschleifenstruktur, in Sequenz 7.11 im Stamm mit Ausbuchtung, in Sequenzen 9.8 und 9.14 am Übergang von Stamm zu terminaler Schleife und in 7.20 und 9.19 in der terminalen Schleife. Das Motiv lag damit an allen möglichen Positionen in der Stammschleife. Auch liegen alle Nukleotide des Motivs bis auf das zentrale A sowohl gepaart wie auch ungepaart vor. Das Sequenzmotiv liegt nach *in silico* Analyse nicht in einer definierten Sekundärstrukturumgebung.

<b>7.11</b>	GGAGATAGATATCAACGGATCAGTACAAATCGAATGCTATGACCATG .....((.(((.((.....))...)))...)
<b>9.8</b>	ATTTGGATCAAAATCTGAAAAGTACAAATATAGCGAGTTTCGTGGA .....(((((((.((.....))..)))))).).
<b>9.14</b>	TATACTCAGTATCAACGTAAAGTACAAATATAAGCGAGTTTCGTGGAT .....(((.(((.(((.((.....))..)))))).)))
<b>7.20</b>	CCAACGGTAAGCACATGTGACAGTACAAATACATAGCGAGTTTCGTGGA (((.(((.((.(((.(((.((.....)))))..))....)))))).
<b>9.19</b>	TTACCTGACGCTATCCTTAAAGTACAAAGTGATGCGAGTTTCGTGGAT ...(((((((.(((.(((.((.....))..)))))).)))..)

**Abbildung 12:**Strukturvergleich der Sequenzen mit Motiv. Das Motiv ist rot eingefärbt. Zur besseren Übersicht ist nur ein Ausschnitt der kompletten Sequenzen dargestellt. Korrespondierend zur Sequenz ist in der Zeile darunter die Sekundärstruktur in Punkt und Klammer Schreibweise abgebildet. Klammer auf zeigt eine Basenpaarung mit einem Nukleotid in 3'-Richtung, Klammer zu mit einem Nukleotid in 5'-Richtung, ein Punkt bedeutet keine Basenpaarung.

Die Einzelsequenzen wurden radioaktiv markiert und auf TEM1-Bindung durch Filterretention und Affinitätschromatographie nach Art der Selex untersucht. Die Ergebnisse von fünf Sequenzen sind in

Abbildung 13 dargestellt. Die restlichen Sequenzen wurden auch untersucht, die Ergebnisse der Filterretention finden sich in Anhang 7.1. Die Haarnadelstruktur mit CAGTACAA-Motiv aus Sequenz 9.14 wurde unter dem Namen Minimalmotiv (Min) mitgeführt. Das Motiv wurde von jeweils 20 nt der 9.14 Sequenz 5'- und 3'-flankiert.



**Abbildung 13: Analyse der Einzelsequenzen.** A Denaturierende PAGE der radioaktiv markierten RNA-Sequenzen. B Filterretentionsassay: Pro Spalte wurde eine Sequenz aufgetragen. KdA ist eine Variante des TetR-bindenden RNA Aptamers mit TetR Protein als Positivkontrolle des Assays. Es wurden Viererwerte aufgenommen, pro Ansatz wurde RNA mit 10 kcpm eingesetzt. Die obere Zeile PBS ist ohne, die untere mit 625 nM TEM1, beziehungsweise TetR in der Spalte KdA. C Säulenchromatographie der Einzelsequenzen nach Selex-Protokoll. Ergebnis dreier unabhängiger Messungen. Dargestellt sind die mittleren Elutionen mit Standardabweichung.

In der Filterretention konnte für die Einzelsequenzen keine TEM1-Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 13B). Die Positivkontrolle TetR/KdA-Aptamer zeigte in Anwesenheit von TetR ein starkes Signal auf dem Filter. Keine der untersuchten Poolsequenzen lieferte ein ähnliches Ergebnis mit TEM1. Um das Ergebnis der Filterretention zu überprüfen, wurde mit den Einzelsequenzen eine TEM1-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Einzelsequenzen wurden nach Selektionsprotokoll auf Säulen mit und ohne TEM1 gegeben, gewaschen und eluiert (Abbildung 13C). Die Elutionswerte schwanken zwar, liegen aber unabhängig von TEM1 bei Werten zwischen 15 und 20%. Lediglich das Minimalmotiv zeigt weder mit noch ohne TEM1 eine Bindung an die Säule. Durch die Säulenchromatographie konnte bei keiner der untersuchten Einzelsequenzen eine spezifische TEM1-RNA Wechselwirkung nachgewiesen werden.

## **3.2 Zweite *in vitro* Selektion**

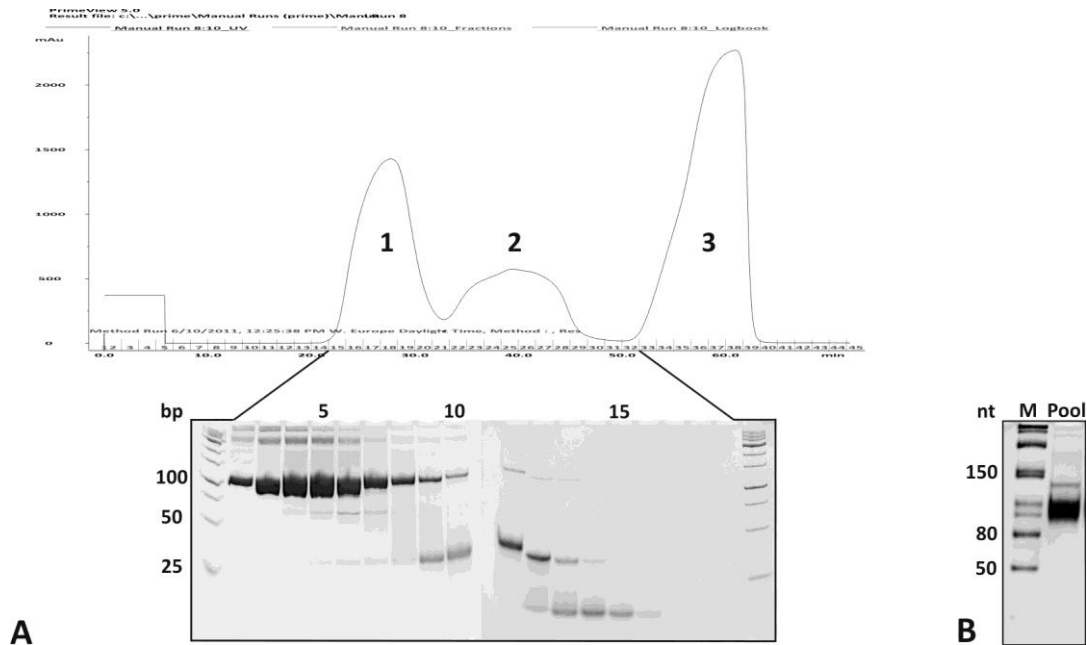
Die erste Selektion zeichnete sich durch hohen Zeitaufwand aus. Die Durchführung einer Selex-Runde dauerte eine Woche. Es wurden ausschließlich radioaktiv markierte RNA-Pools verwendet, wodurch nach jeder Runde der Selektionsfortschritt überprüft werden konnte. Die Selektionsbedingungen wurden stets an den aktuellen Selektionsfortschritt angepasst. Eine Runde wurde unter verschiedenen Bedingungen wiederholt, bis ein Fortschritt zur vorherigen Runde erreicht wurde.

Im nächsten Anlauf wurde eine alternative Strategie verwendet. Mehrere zeitverkürzte Selektionen sollten parallel durchgeführt werden. Das entsprechende Selektionsprotokoll wurde von der Arbeitsgruppe Mayer aus Bonn übernommen (142). Der initiale Pool wurde in größerem Maßstab hergestellt (4). Es wurden weitere Zielproteine ausgewählt, um die Erfolgswahrscheinlichkeiten der Selektion zu erhöhen.

### **3.2.1 Der neue Initial-Pool**

Bei der initialen PCR ist ein Überschuss an Oligonukleotid- über Template-DNA notwendig, um eine hohe Ausbeute des spezifischen PCR-Produktes zu erhalten. Die maximale Oligonukleotid-Konzentration lag bei 2  $\mu$ M, eine höhere Konzentration verbesserte die Ausbeute nicht mehr. Für einen größeren Überschuss an Oligonukleotid musste deshalb die Template-DNA verdünnt werden, wodurch sich das PCR-Volumen vervielfachte. Der neue PCR-Ansatz umfasste 130 ml statt 2 ml, die finale Template-Konzentration wurde von 500 nM auf 10 nM gesenkt. Als Folge der geringeren Konzentration konnte im PCR-Produkt fast keine Template-Bande nachgewiesen werden, dafür aber noch deutliche Mengen an Oligonukleotid. Statt dem zunächst geplanten 100 ml Ansatz wurden insgesamt 130 ml PCR angesetzt, um Volumenverluste durch Verdunstung während der Reaktion auszugleichen. Das PCR-Produkt wurde gefällt und durch Gelfiltration gereinigt. Das Ergebnis der Poolpräparation ist in Abbildung 14 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 14:** A Gelfiltration der initialen PCR, dargestellt ist die Absorption bei 260 nm in blau. Die *Peaks* der Gelfiltrationen sind von 1 bis 3 nummeriert. Darunter: native PAGE ausgewählter Fraktionen. B denaturierende PAGE des fertiggestellten RNA-Pools (1 µl).

Die Gelfiltration wurde an einer Sephacryl-S100 16/60 Säule durchgeführt. Die Absorption des Durchflusses wurde bei 260 nm bestimmt und ist in Abbildung 14 dargestellt. Es wurden drei *peaks* gemessen. Die Fraktionen der ersten beiden *peaks* wurden durch native PAGE analysiert. Der erste *peak* konnte danach dem PCR-Produkt zugeordnet werden, der zweite etwas breitere *peak* war die Überlagerung der Oligonukleotid-*peaks*. In der Gelfiltration sinkt die Retentionszeit mit steigendem Volumen des untersuchten Moleküls. *Peak 3* musste also aus Molekülen bestehen, die deutlich kleiner als die Oligonukleotide waren. *Peak 3* wurde daher den dNTPs zugeordnet. Unterhalb der Produktbande ist von der fünften bis zur siebten Spur eine leichte Bande zu erkennen, bei der es sich der Größe nach um *template*-Oligonukleotid handelt. Durch die Gelfiltration konnte das PCR-Produkt beinahe vollständig von Nukleotiden und Oligonukleotiden gereinigt werden.

Die Ausbeute an PCR-Produkt betrug 15 nmol, das entspricht der 12-fachen Menge der eingesetzten 1,3 nmol Template, man spricht von 12 Poolkopien (4). In die Transkription wurden vier Kopien des dsDNA-Pools als *template* eingesetzt, es wurde der Ansatz der zweiten Selektion verwendet. Nach Aufreinigung durch präparative PAGE wurden 60 nmol RNA-Pool erhalten, ausreichend für alle folgenden Selektionen. Nach Protokoll wurde 1 nmol RNA-Pool mit einer geschätzten Variabilität von  $10^{14}$  individuellen Sequenzen in die Selektion eingesetzt.

### 3.2.2 Neue Zielproteine

Die erste Selektion mit TEM1 konnte keine spezifischen Aptamere generieren. Zunächst wurden die Ursachen dafür im Selektionsprotokoll gesucht. Es wurden Verbesserungen im Protokoll

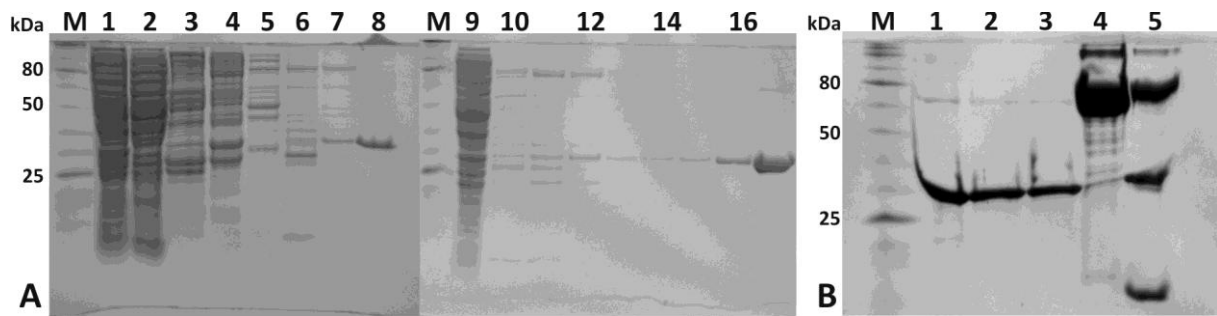
vorgenommen, gleichzeitig wurde aber auch TEM1 als Zielprotein hinterfragt. Für den Fall, dass TEM1 kein geeignetes Zielprotein für eine RNA-Selex ist, wurden weitere Zielproteine ausgewählt. Insgesamt wurde die Selektion mit vier weiteren PBP durchgeführt. Die PBP besitzen alle eine penicillinbindende Domäne, jedoch diverse Funktionen und sind verschiedenen Untergruppen der Proteinfamilie zugeordnet. Eine möglichst breite Streuung in der Proteinauswahl sollte die Wahrscheinlichkeit einer positiven Selektion erhöhen.

**Tabelle 5: Proteine der PBP-Familie, gegen die eine SELEX durchgeführt wurde.**

Protein	Organismus	Beschreibung
<b>TEM1</b>	<i>E. coli</i>	Klasse A $\beta$ -Lactamase, ESBL
<b>NDM1</b>	<i>K. pneumoniae</i>	Klasse B metallo- $\beta$ -Lactamase, Carbapenemase
<b>MecR1</b>	<i>S. aureus</i>	$\beta$ -Lactam-Rezeptor, penicillinbindende Domäne
<b>PBP2x</b>	<i>S. pneumoniae</i>	HMW Transacetylase/ Transpeptidase
<b>Putative <math>\beta</math>-Lactamase</b>	<i>E. faecalis</i>	nicht klassifiziert

Die Proteinaufreinigung, Selex-Vorbereitung, Durchführung und Auswertung wird am Beispiel von NDM1 gezeigt, da nur bei dieser Selektion ein spezifisch angereicherter RNA-Pool erzeugt werden konnte. Die Ergebnisse der anderen Proteinpräparationen und Selektionen befinden sich in Anhang 7.2. NDM1 wurde in *E. coli* BL21 über Nacht bei 16°C in LB-Medium überexprimiert. Als Expressionsplasmid wurde pET-16b verwendet, die Expression wurde durch 1 mM IPTG induziert. Die NDM1-Sequenz (Aminosäure G29 bis R270 ohne die N-terminale Export-Signalsequenz) lag auf dem Vektor pET-16b vor. Ohne Signalsequenz wird prozessiertes NDM1 im Zytoplasma exprimiert und nicht ins Periplasma exportiert. NDM1 war mit einer N-terminalen 6His-Markierung versehen und wurde durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus Zelllysat aufgereinigt. Anschließend wurde es biotinyliert und an Streptavidin-beschichtete magnetische *beads* (Dynabeads) gekoppelt. Die Überexpression, Aufreinigung und Kopplung ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Ausbeute der Aufreinigung betrug jeweils nur 1 bis 2 mg NDM1. Da allerdings zum Koppeln an die Dynabeads nur 100  $\mu$ g verwendet wurden, bestand kein Optimierungsbedarf der Aufreinigung.

## Ergebnisse



**Abbildung 15** A Überexpression von NDM1; 1 vor, 2 nach Induktion mit 1 mM IPTG, Expression über Nacht bei 16°C; 3 unlösliche Fraktion; 4 Lysat; 5 bis 8 Ni-NTA Säule Waschfraktionen (20 mM Imidazol); 9 Lysat; 10 bis 17 Ni-NTA Säule Elutionsfraktionen, Steigerung der Imidazolkonzentration: 50, 100, 200, 500 mM; zwei Fraktionen pro Konzentration. B Koppeln von NDM1 an Dynabeads M280; 1 vor-, 2 nach Biotinylierung, jeweils 2 µg NDM1; 3 Überstand nach Kopplungsreaktion; 4 vereinigte Waschfraktionen; 5 Elution durch Hitzedenaturierung.

### 3.2.3 Verbesserte *in vitro* Selektion

Die Selektion wurde nicht mit radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Erst in der Auswertung danach wurde Radioaktivität verwendet. Die Selektion wurde nach einer zuvor definierten Strategie durchgeführt, die nicht im Verlauf verändert wurde. Da das neue Protokoll wesentlich schneller war, konnte die Selektion innerhalb einer Woche durchgeführt werden. Das neue Protokoll ist in jedem Schritt auf Geschwindigkeit optimiert, womit ein hoher Durchsatz an Selektionen ermöglicht wird. Das Weglassen von radioaktiver Markierung ist eine wesentliche Vereinfachung. Die Selektion mit magnetischen *beads* war schneller als die Säulenchromatographie. Die Transkriptionszeit wurde verkürzt, reverse Transkription und PCR wurden zu einer RT-PCR zusammengefasst. Schließlich wurden die DNA- und RNA-Pools während der Selektion nicht aufgereinigt. Die Qualität der Pools wurde nach PCR und Transkription durch analytische Gelelektrophorese kontrolliert.

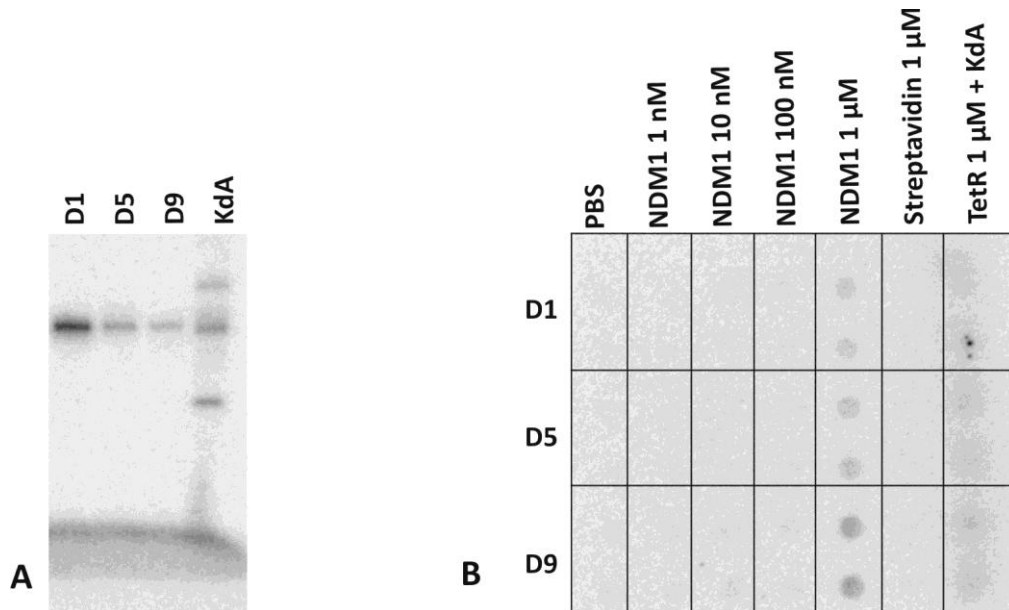
In der Selektion wurde der RNA-Pool eine halbe Stunde bei 37°C mit Zielprotein-beschichteten Dynabeads inkubiert. Anschließend wurden die *beads* gewaschen, wobei die Anzahl Waschschrte über die Selektion gesteigert wurde. Die Zahl der Waschschrte bestimmte die Stringenz der Selektion. Nach dem Waschen wurde thermisch eluiert. Bei einer Temperatur von 80°C löste sich die Streptavidin-Biotin Bindung, sodass Protein-RNA-Komplexe in Lösung gingen. Der Überstand nach der Elution wurde direkt in die RT-PCR eingesetzt. Die PCR wurde solange fortgeführt, bis eine deutliche Produktbande im Agarosegel erkennbar war. Das PCR-Produkt wurde direkt als *template* in die Transkription eingesetzt. Das Transkriptionsprodukt wiederum wurde direkt für die nächste Selektionsrunde verwendet.

### 3.2.4 Auswertung der Selektion

Es wurden neun Selektionsrunden durchgeführt, dann wurden RNA-Pools aus Runde 1, 5 und 9 (D1, D5, D9) durch Filterretention auf NDM1-Bindung untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Filterretention zeigte Signale der Pools bei einer NDM1-Konzentration von 1 µM. Die

## Ergebnisse

Intensität der Signale verstärkt sich von D1 bis D9. Gleichzeitig sind keine unspezifischen Signale in der Puffer- (PBS) oder Streptavidinkontrolle sichtbar. Das Ergebnis der Selektion war daher eine spezifische Anreicherung des Pools D9 gegen NDM1.



**Abbildung 16** Auswertung der NDM1-Selektion, die mit dem Buchstaben D bezeichnet wurde. **A:** denaturierende PAGE der radioaktiv markierten RNA-Pools aus Runde 1, 5 und 9 sowie der KdA-RNA zur Positivkontrolle. **B** Filterretention der radioaktiv markierten Pools gegen steigende NDM1-Konzentration von 1 nM bis 1  $\mu$ M. Als Negativkontrollen dienen eine Spalte ohne Protein (PBS) und eine Spalte mit Streptavidin statt NDM1. Die Positivkontrolle TetR+KdA ist ganz rechts aufgetragen.

Da das Signal nur bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M auftrat, sollte als nächstes eine konzentrationsabhängige Bindung nachgewiesen werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung wurde wieder durch Filterretention überprüft. Dabei wurden NDM1-Konzentrationen zwischen 100 nM und 4  $\mu$ M gewählt. Die Filtermembran wurde mittels Phosphoimaging ausgelesen und mit dem Programm Image J quantifiziert. Die Signalintensität wurde dabei auf die eingesetzte Gesamtintensität normalisiert, das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.



## Ergebnisse

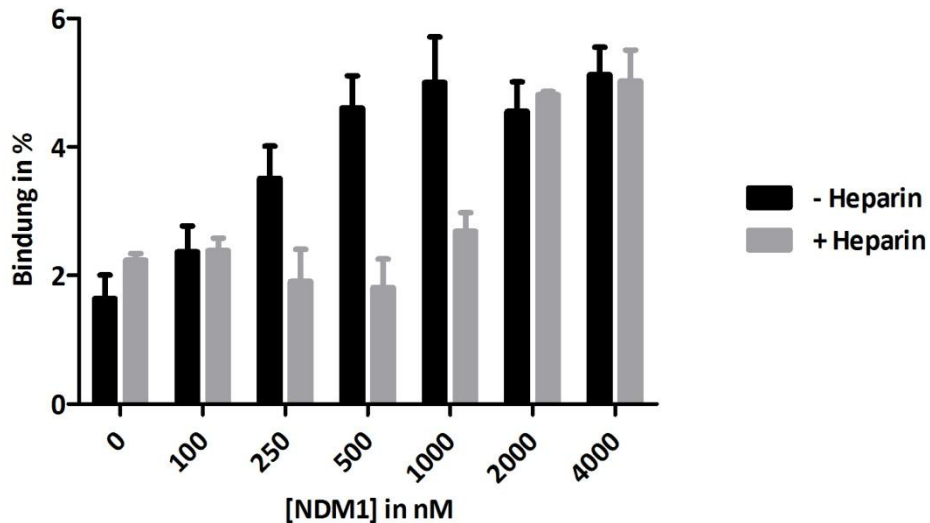


Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit der NDM1-D9-Bindung. Filterretentionsassay als Balkendiagramm. Intensitäten der Signale auf dem Filter wurden durch Image J quantifiziert und auf die Intensität der Gesamtaktivität normalisiert. Es sind zwei Versuchsreihen abgebildet, RNA-Pool D9 gegen NDM1 mit und ohne Heparin. Die Werte unter dem Diagramm geben die NDM1-Konzentration in nM an.

In der Konzentrationsreihe „D9 ohne Heparin“ steigt der gebundene Anteil RNA zunächst mit der NDM1-Konzentration und stagniert dann ab 1  $\mu$ M NDM1. Eine zweite Reihe wurde in Anwesenheit von Heparin durchgeführt, einem sulfatisierten Glycosaminoglycan. Durch seine negative Ladung kann Heparin mit der ebenfalls negativ geladenen RNA um die Proteinbindung kompetieren, falls die RNA-Protein-Bindung im Wesentlichen auf ionischen Wechselwirkungen beruht. Der Versuch mit Heparin zeigt, dass die Bindung von D9-Pool an NDM1 durch Zugabe von Heparin abgeschwächt werden kann. Heparin kompetitiert mit RNA-Pool D9 um die Bindung an NDM1.

### 3.2.5 Anschlussselektionen

Die D9-NDM1-Interaktion wurde mit 5% gebundener RNA-Fraktion am Filter (Abbildung 17) als schwache Bindung eingestuft. Durch weitere Selektionen sollte die Bindung verbessert werden. Zunächst wurde die Selektion bis Runde 12, dann bis Runde 15 fortgesetzt, die Ergebnisse der weiteren Selektionen befinden sich in Anhang 7.2. Es konnte keine Verbesserung der Pools D12 oder D15 im Filterretentionsassay beobachtet werden. Im Gegenteil nahm der Anteil spezifisch gebundener RNA eher ab, dafür verstärkten sich unspezifische Signale in den Negativkontrollen mit PBS und Streptavidin. Zusätzlich wurde die Bande des RNA-Pools in den Gelkontrollen zunehmend inhomogen, es entwickelten sich distinkte Banden knapp unter- oder oberhalb der Haupt-Poolbande. Diese distinkten Banden in der Nähe der Poolbande verstärkten sich von Runde zu Runde bei gleichzeitiger Abschwächung der Poolbande. Kein Pool mit solchen distinkten Banden zeigte in der Filterretention eine verbesserte Bindung an NDM1.

Die NDM1-Selex wurde mehrmals wiederholt, zunächst mit dem gleichen Protokoll, dann in Anwesenheit von Heparin. Weiterhin wurde eine Selektion mit spezifischer Elution durchgeführt. Statt durch Hitzedenaturierung zu eluieren wurde 1 mM Ampicillin zur spezifischen Elution verwendet. Die Wiederholungen der Selektion ergaben jedoch auch keine Verbesserungen der NDM1-Bindung (siehe Anhang 7.2).

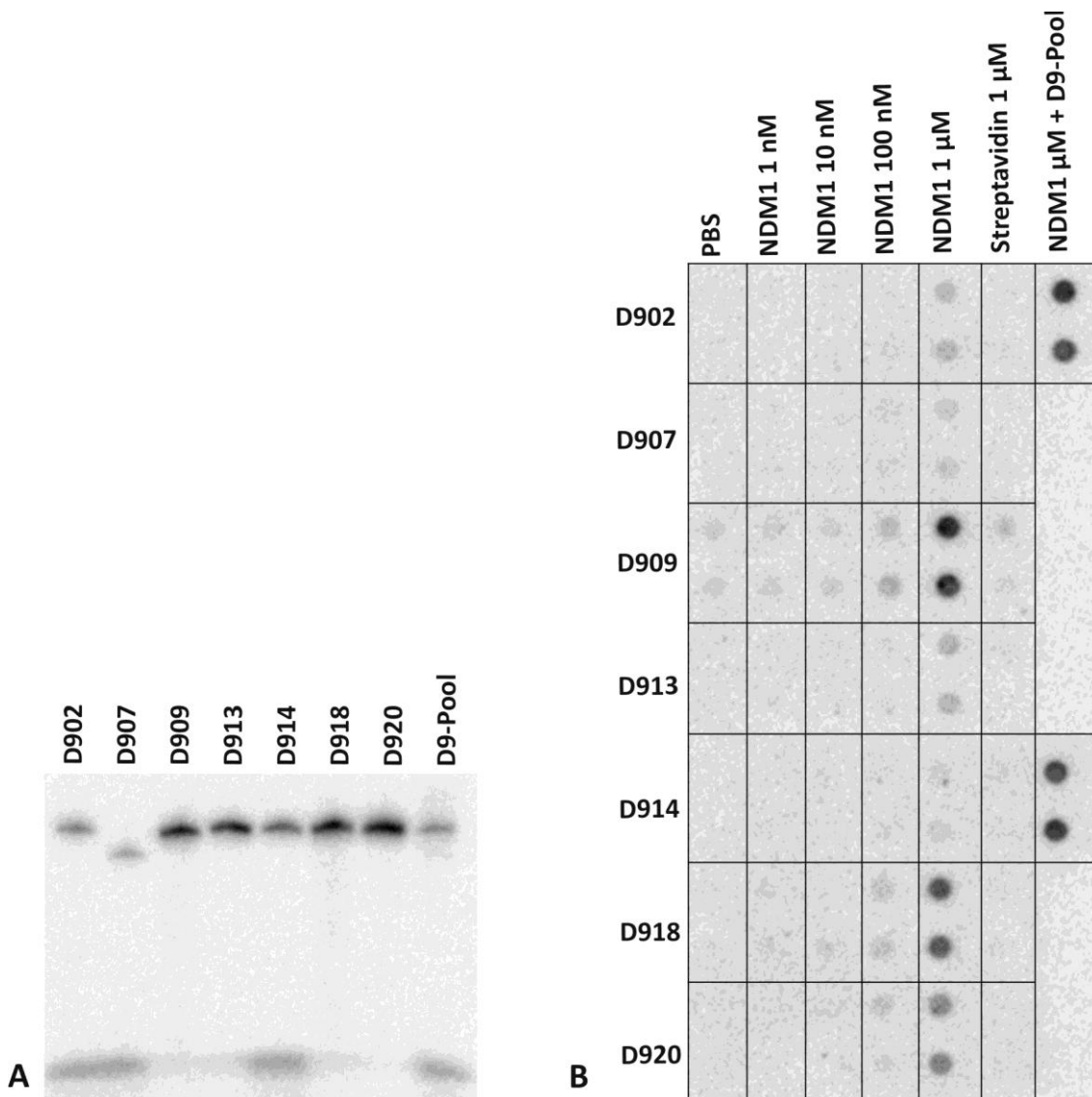
### 3.2.6 Charakterisierung der Einzelsequenzen

Parallel zu den Anschlussselektionen wurden Einzelsequenzen aus dem D9-Pool charakterisiert. Der D9-Pool wurde auf Einzelsequenzen untersucht, die bessere Bindungseigenschaften als D9 aufweisen. Aus D9 wurden 20 Klone sequenziert, von denen 14 eine N50-Sequenz trugen. Von diesen 14 waren acht Sequenzen identisch, insgesamt wurden also sieben Einzelsequenzen untersucht. Die Sequenzen sind in Tabelle 6 dargestellt. Sie sind nach dem Pool D9 und dem sequenzierten Klon in fortlaufender Nummerierung benannt. D902 war die Sequenz, die achtmal in der Sequenzierung auftrat. D907 bestand nur aus 34 nt. Alle Sequenzen wurden auf gemeinsame Motive untersucht. Es konnten einige kurze Motive gefunden werden, die in Tabelle 6 farbig markiert sind. Die Motive traten im Wesentlichen in den Sequenzen D909, D918 und D920 auf. Der Purin- und GC-Gehalt der Sequenzen bewegte sich bis auf drei Ausnahmen zwischen 40% und 60%. Der Purin Gehalt von D907 sowie der GC-Gehalt von D918 und D920 lagen unter 40%.

Tabelle 6: Individuelle Sequenzen aus dem angereicherten Pool D9.

#	Sequenz	Purin	GC
<b>D902</b>	CTGTTTGGCAATGGACGCGTGTAATCCTGGAGTAGACCGAGATCCTCTA	52%	50%
<b>D907</b>	TACCTTAAGTC <b>CGGT</b> TCAGTTCCCCGGCTGGTT-----	35%	56%
<b>D909</b>	<b>CCGGT</b> TGAG <b>TGT</b> GTAGGAT <b>GAGT</b> GAGGTTCTGTGGCGAGTTTAAAGT--	60%	48%
<b>D913</b>	CTCGCCTCAATTGGTAGCTGGATATTGGCTGCTGCAACATCTACATTAAA	46%	44%
<b>D914</b>	CCAACTACCCAAAGCTGCGATGGCTCATCGTAAAGCGAGATTTCCGATAG	54%	48%
<b>D918</b>	TGATCATG <b>TTCTGTGG</b> CTAATTAGAG <b>TG</b> TTTTGTTTGTGACGG <b>TAGTAA</b> -	49%	37%
<b>D920</b>	<b>CGGT</b> TAA <b>TAGTAA</b> GAAAGGGACTATTTAT <b>TTCTGT</b> AAATT <b>TGTTGT</b> TTTGA	52%	28%

Die Sequenzbezeichnung setzt sich aus Pool- und Klonnummer zusammen. Wiederkehrende Motive in den Sequenzen sind farbig markiert. Weiterhin ist der Purin- und GC-Gehalt in % angegeben.



**Abbildung 18:** Charakterisierung von Einzelsequenzen aus D9-Pool. **A** denaturierende PAGE der radioaktiv markierten Einzelsequenzen. **B** Filterretention der radioaktiv markierten Sequenzen gegen steigende NDM1-Konzentration von 1 nM bis 1  $\mu$ M. Als Negativkontrollen dienten eine Spalte ohne Protein (PBS) und eine Spalte mit Streptavidin statt NDM1. Als Positivkontrolle wurde D9-Pool RNA mit 1  $\mu$ M NDM1 aufgetragen. Die Abbildungen wurden durch Phosphoimaging generiert.

Die RNA-Sequenzen wurden radioaktiv markiert und durch Filterretention untersucht, als Positivkontrolle diente D9. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei der am häufigsten vertretenen Sequenz D902 konnte keine NDM1-Bindung festgestellt werden. Von den anderen Sequenzen zeigten D909, D918 und D920 eine NDM1-Bindung. D907, D913 und D914 zeigten wie D902 nur eine schwache Bindung. Bei keiner der untersuchten Sequenzen konnte eine NDM1-Bindung bei geringeren Konzentrationen als 1  $\mu$ M nachgewiesen werden. Die höchste Signalintensität wurde bei D909 gemessen, vergleichbar D9. Durch die Programme RNAfold (140) und RNASHapes (141) wurden für die Sequenzen schwache, variable Sekundärstrukturen vorhergesagt. Zusätzlich teilen die Sequenzen kein offensichtliches gemeinsames Sequenzmotiv. D909 wurde als bindungsstärkste Sequenz weiter untersucht.

### 3.2.7 *Doped-Selelex*

Auf Grundlage der Sequenz D909 wurde ein neuer RNA-Pool generiert, um eine sogenannte *doped-Selelex* durchzuführen. Die Poolsequenzen sollten sich nur in wenigen Nukleotiden von D909 unterscheiden. Der Pool wurde so erstellt, dass jede Base der N50-Sequenz zu 80% identisch mit D909 und zu 20% gegen eine beliebige andere Base ausgetauscht war. Der *doped*-Pool enthielt damit D909-ähnliche Sequenzen mit etwa 10 Basenaustauschen pro Sequenz. Die *doped-Selelex* startete mit einem Pool, der für eine NDM-Bindung prädisponiert war und deckte den Sequenzraum um D909 ab. Variationen von D909 mit besseren Bindungseigenschaften zu NDM1 können so gefunden werden. Die Selektion wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Nach vier Runden Selektion war eine maximale spezifische Anreicherung in der Filterretention erkennbar, die aber keine Verbesserung zur Ausgangssequenz D909 darstellte. Es wurden wie bei D909 und D9-Pool keine Signale auf der Filtermembran bei NDM1-Konzentrationen unter 1  $\mu$ M festgestellt. Das Ergebnis der *doped-Selelex* ist im Anhang 7.2 dargestellt.

### 3.2.8 *Bindemotive in D909*

Parallel zur *doped-Selelex* wurde D909 durch Sequenzverkürzung untersucht. Wenn das Entfernen eines bestimmten Sequenzbereichs zu einem Verlust der NDM1-Bindung führte, könnte ein mögliches Bindemotiv identifiziert werden. Verkürzte Versionen von D909 wurden von 5'- und 3'-Seite in 10 nt Schritten erstellt. Die dsDNA-*templates* für die Transkription wurden durch PCR erstellt, die Transkription wurde nach neuem Selelexprotokoll durchgeführt. Die radioaktiv markierten Verkürzungen wurden durch Filterretention auf NDM1-Bindung untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

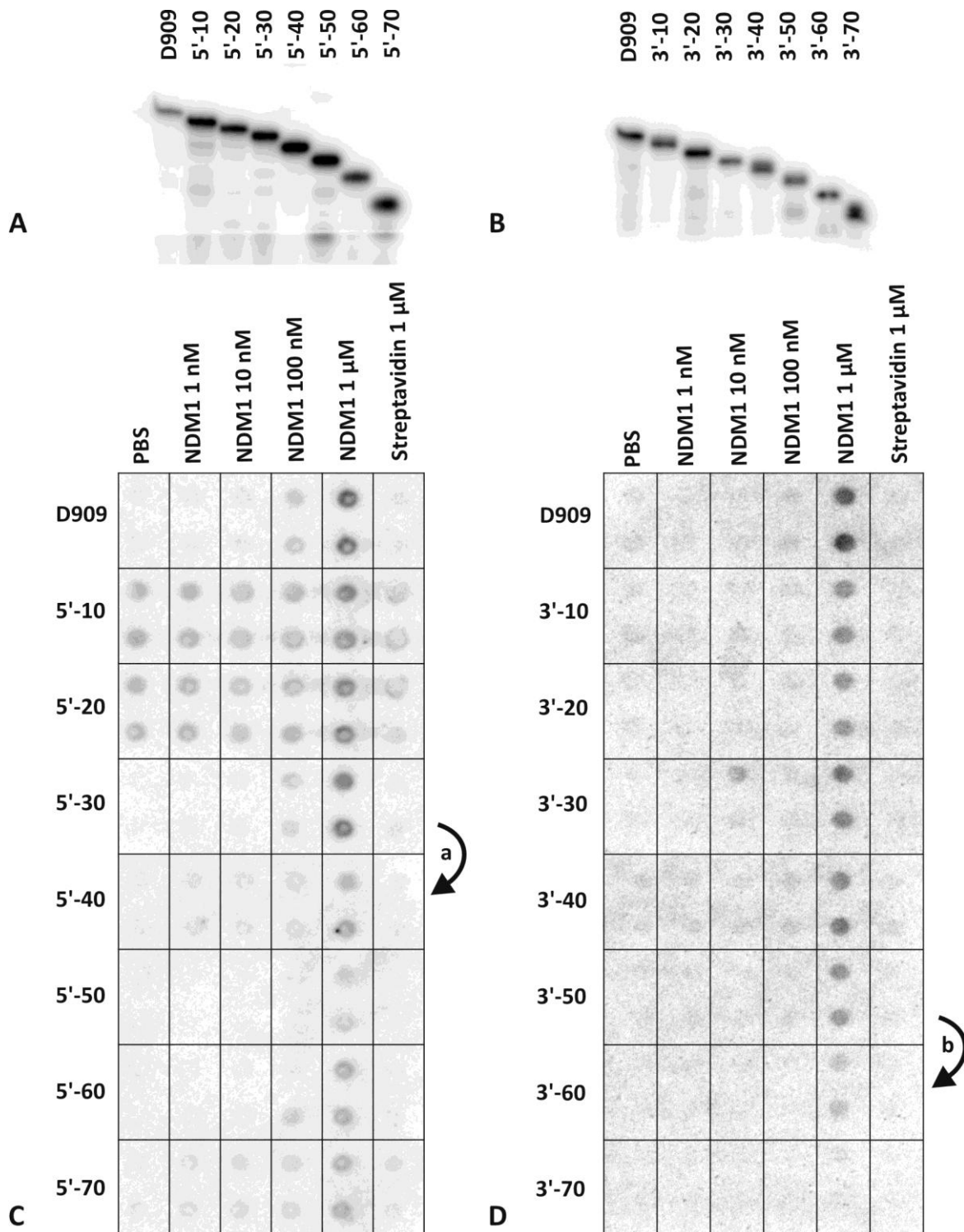


Abbildung 19 A und B denaturierende PAGE radioaktiv markierter D909 Verkürzungen; A 5'-, B 3'-verkürzt; C und D Filterretentionen der D909-Verkürzungen (C 5'-, D 3'-verkürzt) gegen NDM1-Konzentration von 1 nM bis 1 µM. Als Negativkontrollen dienten eine Spalte ohne Protein (PBS) und eine Spalte mit Streptavidin statt NDM1.

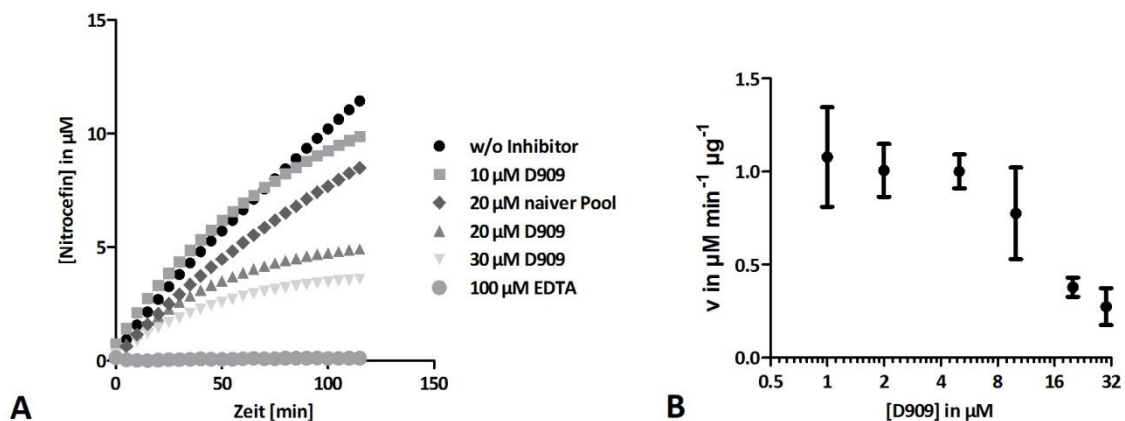
Abbildung 19 A und B zeigen die Ergebnisse der analytischen PAGE. Die radioaktiv markierten RNAs sind von links nach rechts mit abnehmender Länge aufgetragen. In Abbildung 19A ist die Verkürzung von 5'-Seite, in Abbildung 19B von 3'-Seite abgebildet. Die Filterretention der 5'-Verkürzungsreihe in Abbildung 19C zeigte einen stufenweisen Rückgang der Bindung. Eine sprunghafte Abnahme der

spezifischen Bindung war von 5'-30 zu 5'-40 sichtbar (Pfeil a). Bei weiterer Verkürzung wurde nur noch eine schwache Bindung nachgewiesen. Es wurde eine verstärkte unspezifische Bindung bei 5'-10 und 5'-20 festgestellt. In der Filterretention der 3'-Verkürzungsreihe war ebenfalls eine Abnahme der Signalintensität mit zunehmender Verkürzung zu erkennen. Dabei wurden zwei sprunghafte Abnahmen beobachtet, zunächst zu 3'-10, dann zu 3'-60 (Pfeil b). Sequenz 3'-70 besteht nur noch aus 5'-konstantem Bereich und zeigt keine Bindung mehr.

Beide Verkürzungsreihen zeigten eine stufenweise Abnahme und keinen abrupten Verlust der NDM1-Bindung. Allerdings, die durch Pfeile gekennzeichneten Stufen überschneiden sich miteinander in der wegfallenden Sequenz GTTG TAGG. Ein Teil dieser Sequenz findet sich auch in der NDM1-bindenden D920 und ist als wiederkehrendes Motiv in Tabelle 6 grün markiert. Faltungsstudien mit RNAfold wiesen das Motiv in D909 als innerhelikale Ausbuchtung einer Stammschleife aus, in den Verkürzungen lag der Bereich komplett ungefaltet vor.

### 3.2.9 Inhibitionstest D909

Die Bindung von D909 an NDM1 konnte bestätigt und ein Bindemotiv eingegrenzt werden. Das Ziel des Projektes bestand jedoch nicht nur in der Entwicklung eines reinen NDM1-Binders, sondern eines Inhibitors. In der Selektion war jedoch nicht auf Inhibition selektiert worden. Im Folgenden sollte die zu dem Zeitpunkt spannende Frage geklärt werden, ob D909 die NDM1  $\beta$ -Lactamase auch inhibiert. Dazu wurde der bereits beschriebene Nitrocefin-Aktivitätstest für  $\beta$ -Lactamasen mit NDM1 in Anwesenheit von D909 durchgeführt. Ähnlich wie bei der Filterretention wurden die RNA-Sequenzen mit NDM1 vorinkubiert, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von Nitrocefin gestartet wurde. Der Aktivitätstest wurde im 96-well Format durchgeführt und im Tecan-Plattenleser in einer Zeitserie vermessen. Durch das 96-well Format konnten viele Ansätze parallel vermessen werden. In Abbildung 20 ist das Ergebnis des Inhibitionstests dargestellt. Gezeigt sind der Reaktionsverlauf gemessen an der Produktkonzentration (A) und Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der D909-Konzentration (B).



**Abbildung 20** Inhibitionstest; A: Reaktionsverlauf in Anwesenheit von Inhibitoren, Produktkonzentration in  $\mu\text{M}$  gegen Reaktionszeit in Minuten. B: NDM1-Aktivität in Abhängigkeit der D909-Konzentration. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  ist angegeben als Produktkonzentration in  $\mu\text{M}$  pro Minute pro NDM1-Konzentration in  $\mu\text{M}$ .

Der Reaktionsverlauf der uninhibierten Reaktion (w/o Inhibitor) stieg über die gesamte Versuchszeit linear an (Abbildung 20A). Mit D909 verlief die Reaktion anders, sie wurde mit der Zeit langsamer. Während der Effekt bei 10  $\mu\text{M}$  D909 noch schwach ausgeprägt war, wurde er bei 20 und 30  $\mu\text{M}$  immer stärker. Am Ende der Reaktionszeit war die Reaktion mit 30  $\mu\text{M}$  NDM1 beinahe gestoppt. Negativkontrollen mit ähnlich hohem Überschuss unspezifischer RNA, 20  $\mu\text{M}$  tRNA oder auch 20  $\mu\text{M}$  naiver Pool zeigten keine Verlangsamung der Reaktion. Es wurde eine EDTA-Positivkontrolle der Inhibition mitgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten für Abbildung 20B wurden aus den Steigungen der Reaktionsverläufe während der ersten halben Stunde berechnet. Die NDM1-Geschwindigkeit ( $v$ ) nahm ab einer D909-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ab. Bei 30  $\mu\text{M}$  D909 wurde die NDM1-Aktivität um 70% gesenkt. Um die Inhibition zu messen wurden lediglich 30 nM NDM1 in die Reaktion eingesetzt, bei einer Erhöhung der NDM1-Konzentration auf 300 nM konnte keine Inhibition mehr gemessen werden. D909 musste also in tausendfachem Überschuss vorliegen, um eine Inhibition nachzuweisen.

### 3.2.10 Zusammenfassung der Selektionsergebnisse

Die Ergebnisse der *in vitro* Selektionen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die erste Selektion gegen TEM1 zeigte im Verlauf eine scheinbar spezifische Anreicherung. In der Auswertung durch Filterretention, EMSA und Säulenchromatographie konnte diese jedoch nicht bestätigt werden. Auch die Einzelsequenzen zeigten keine TEM1-Bindung. Das Protokoll der zweiten Selektion war wesentlich schneller als das der Ersten, sodass insgesamt gegen fünf Zielproteine selektiert werden konnte. Allein bei der Selektion gegen NDM1 wurde eine spezifische Anreicherung erreicht. Da die RNA-Proteinbindung nur bei hohen NDM1-Konzentrationen gemessen werden konnte, wurden weitere Selektionen zur Verbesserung der Bindung durchgeführt. Die Einzelsequenz D909 aus der

## Ergebnisse

ersten Selektion blieb dennoch der stärkste NDM1-Bindungspartner. Ein Bindemotiv im 5'-Bereich der N50 von D909 konnte identifiziert werden. In hohen Konzentrationen von über 10  $\mu\text{M}$  konnte D909 die NDM1-Aktivität spezifisch inhibieren.



### 3.3 Heterologe Expression von RNA-Schaltern

Aptamere sind ein wichtiger Baustein in der synthetischen Biologie. Die ersten bekannten Aptamere wurden durch *in vitro* Selektionen erzeugt, wie im ersten Teil beschrieben. Später wurden Aptamere in natürlichen Systemen wie Bakterien gefunden, wo sie vor allem als Metabolitsensoren dienen. Im 5'-UTR von mRNA sind sie Teil RNA-basierter Genschaltern, kurz RNA-Schalter oder englisch *riboswitches* genannt. In der folgenden Studie wurden purinbindende Aptamere als molekulare Bausteine in heterologen Systemen eingesetzt. Der Schwerpunkt der Studie lag auf der Frage, ob natürliche Aptamere in Nicht-Wirtsorganismen als Genschalter funktional sind.

Natürliche RNA-Schalter aus zum Teil exotischen Bakterienarten wurden in Labororganismen getestet. Diese RNA-Schalter sollten als molekulare Bausteine dem Baukasten der synthetischen Biologie zugeführt werden und sind in Tabelle 7 dargestellt. Die in dieser Studie verwendeten Adenin-Schalter werden im Folgenden nach den Genen benannt, die sie regulieren. *Add* aus *V. vulnificus* codiert für eine Adenin-Deaminase, *pbuE* aus *B. subtilis* für einen Adenin-Exporter.

Tabelle 7: Übersicht der bearbeiteten Aptamere, benannt nach ihren Liganden

Aptamer	Wirt	Zielorganismus
Adenin ( <i>add</i> )	<i>V. vulnificus</i>	<i>E. coli</i>
Adenin ( <i>pbuE</i> )	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
2'dG ( <i>mfl</i> )	<i>M. florum</i>	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
2'dG ( <i>hybrid</i> )	<i>J. woehnert</i>	<i>B. subtilis</i>

#### 3.3.1 Der Adenin-Schalter *add*

Zunächst sollte ein adeninabhängiger RNA-Schalter in *E. coli* etabliert werden. Zur Auswahl stand der translationale Schalter *add* aus *V. vulnificus* und der transkriptionelle Schalter *pbuE* aus *B. subtilis*. Da in Gram negativen Bakterien hauptsächlich translationale RNA-Schalter bekannt sind, wurde mit *add* begonnen. Die beschriebene *add*-Schaltersequenz wurde in die 5' UTR eines plasmidständigen *lacZ*-Reportergens kloniert, das unter Kontrolle des konstitutiven  $\beta$ -Lactamase-Promotors stand. Das Plasmid mit Namen pWH948\_ *add* \_ARS wurde in *E. coli* transformiert und die Enzymaktivität der von *lacZ* kodierten  $\beta$ -Galactosidase in Abhängigkeit von der Adeninkonzentration gemessen. Da *add* als An-Schalter beschrieben ist, sollte die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit zunehmender Adeninkonzentration im Medium ansteigen. In Abbildung 21A sind die gemessenen Konstrukte schematisch dargestellt. Der RNA-Schalter wurde sowohl alleine, als auch mit natürlichem Sequenzkontext in die 5'UTR kloniert. Die Konstrukte wurde nach der Länge des 5' und 3'

## Ergebnisse

eingefügten Kontexts benannt. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsmessung sind in Abbildung 21B dargestellt.

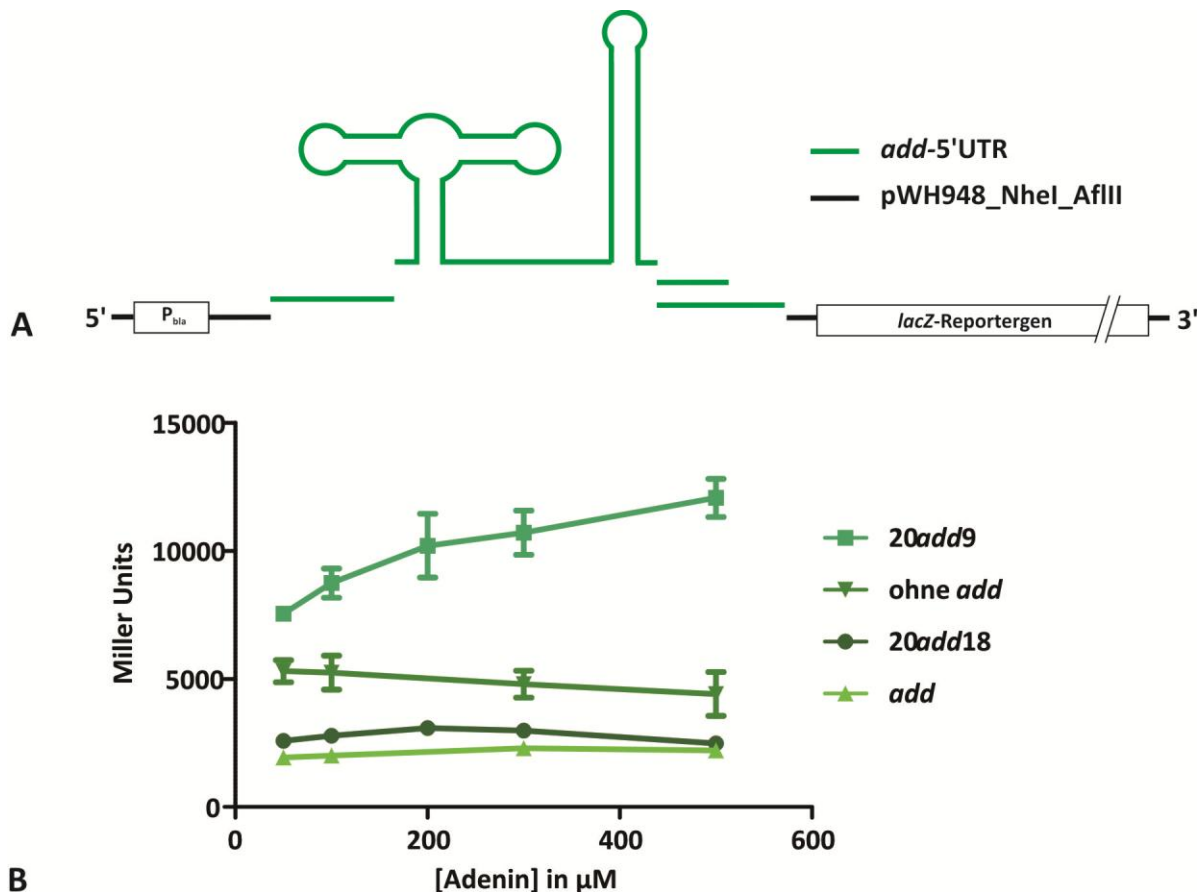


Abbildung 21 A: Schematischer Aufbau der Konstrukte; *add* Schalter mit umgebenden Sequenzbereichen 20 nt 5', 9 und 18 nt 3' des Riboswitches, eingebettet in den 5'-UTR des LacZ-Gens. B:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Miller Units in Abhängigkeit der Adeninkonzentration im Medium. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Ohne *add* zeigt das Ausgangsplasmid keine adeninabhängige  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, mit der *add*-Schaltersequenz im 5'UTR jedoch auch nicht. Erst durch Einbetten von *add* in den originalen Sequenzkontext aus *V. vulnificus* mit 20 nt 5' und 9 nt 3' des Riboswitches kann die erwartete Induktion beobachtet werden. Der 3'-Bereich von *add* wurde weiter variiert, doch eine Verlängerung des Originalkontextes führte zu einem Verlust der Regulation, wie 20*add*18 zeigt.

Bei dem Ausgangsplasmid wurden etwa 5000 MU gemessen, mit *add* nur noch etwa 2000 MU. Bei 20*add*9 steigt die Aktivität von 8000 auf 12000 MU, 20*add*18 liegt wieder im Bereich von *add*. Prinzipiell wurde eine Regulation bei 20*add*9 um den Faktor 1,5 beobachtet. Allerdings war der Ausgangswert bei 50  $\mu$ M Adenin bereits 1,5-fach gegenüber dem Ausgangsplasmid erhöht. Der Schalter reagiert zwar geringfügig auf Adenin, allein seine Anwesenheit verstärkt jedoch schon die Expression. Das Konstrukt *add* ohne Sequenzkontext reduzierte die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität um den Faktor 2,5 gegenüber dem Ausgangsplasmid, zeigte dann aber keinen adeninabhängigen Anstieg.

Der Regulationsfaktor sollte durch folgende Veränderungen optimiert werden: 1) Es wurde nicht mehr mit *E. coli* DH5 $\alpha$ , sondern mit dem Wildtypstamm WH207 gearbeitet. 2) Die Reaktionstemperatur wurde auf 20°C gesenkt, dem Temperaturoptimum von *V. vulnificus*. Es bestand die Vermutung, dass der RNA-Schalter temperatursensitiv ist und sich bei 37°C nicht in die Aus-Konformation falten kann. 3) Es wurde M9-Minimalmedium statt LB-Vollmedium verwendet, um die eingesetzte Adeninkonzentration exakt bestimmen zu können. 4) Die Adeninkonzentration wurde bis an die Löslichkeitsgrenze erhöht. 5) Weitere Konstrukte mit 3'-Kontexten von 3 nt bis 18 nt wurden kloniert und auf Schalteraktivität getestet. Keine dieser Maßnahmen führte jedoch zu einer verbesserten Regulation, für die weiteren Arbeiten waren die Erkenntnisse mit *add* jedoch eine wichtige Grundlage.

### 3.3.2 Der Adenin-Schalter *pbuE*

Der *pbuE*-Schalter aus *B. subtilis* war ebenfalls ein adeninabhängiger An-Schalter, der allerdings auf Transkriptionsebene regulierte. Der *pbuE* A-Riboswitch wurde wie *add* in die 5'UTR von *lacZ* kloniert. Als Plasmid wurde pWH948 verwendet, ein Vorläufer von pWH948\_NheI\_AflII ohne die Restriktionsschnittstellen. Der *pbuE* A-Schalter wurde in den ursprünglichen Vektor pWH948 durch mehrstufige PCR kloniert. Die komplette 5'UTR von *lacZ* wurde dabei gegen die *pbuE*-5'UTR aus *B. subtilis* ausgetauscht. Der Transkriptionsstart des *pbuE*-Gens aus *B. subtilis* war bekannt (143), sodass der *pbuE*-Schalter in vollständiger nativer 5'UTR-Umgebung vorlag. In Abbildung 22A ist Reporter-genkonstrukt schematisch dargestellt. Das Ausgangsplasmid pWH948 und das klonierte Plasmid pWH948\_*pbuE* wurden in *E. coli* WH207 transformiert. Beide Konstrukte wurden auf adeninabhängige RNA-Schalteraktivität durch  $\beta$ -Galactosidase-Test untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22B dargestellt.

## Ergebnisse

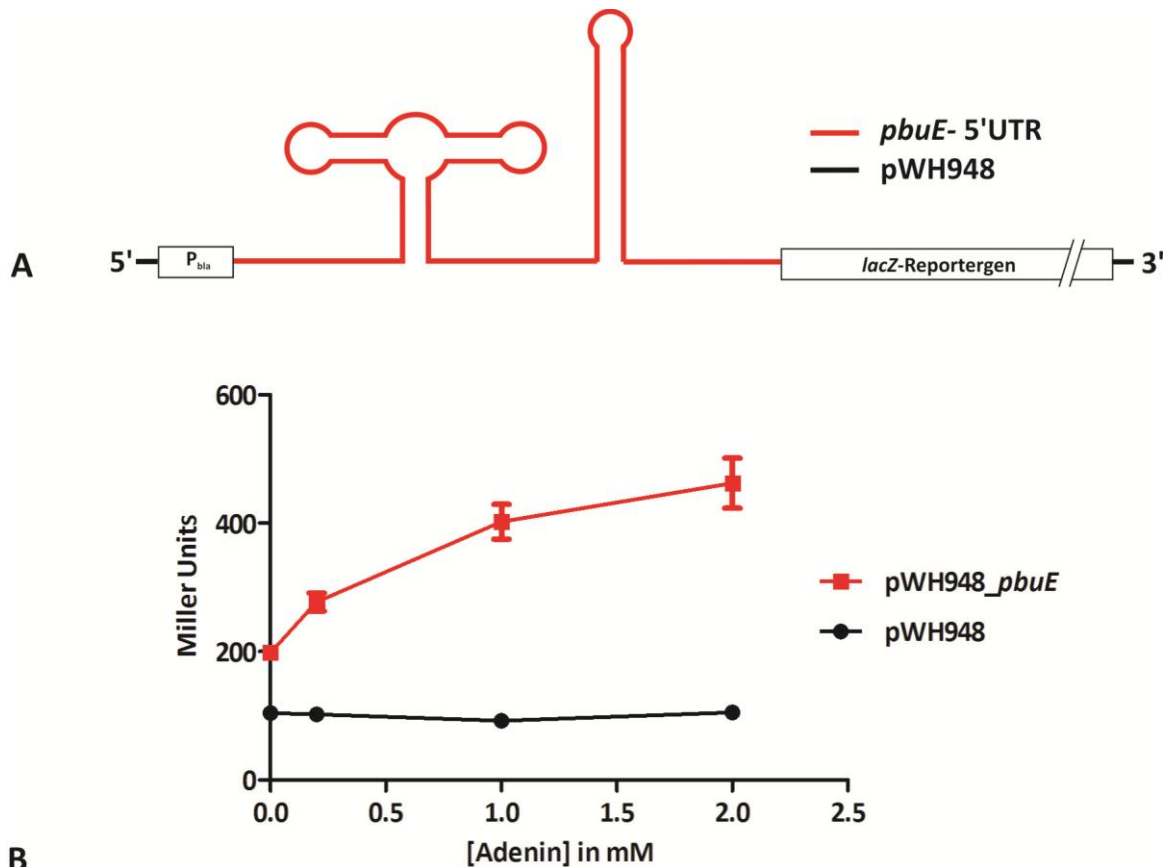


Abbildung 22 A: pWH948\_pbuE Konstrukt, 5'UTR des *lacZ*-Gens ist komplett gegen den *pbuE*-5'UTR (rot) aus *B. subtilis* ausgetauscht. B:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Miller Units in Abhängigkeit der Adeninkonzentration im Medium. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen

Das Konstrukt pWH948\_pbuE zeigte einen 2- 2,5-fachen Anstieg der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit zunehmender Adeninkonzentration. Die Expression des Ausgangskonstrukts pWH948 ohne *pbuE* war nicht adeninabhängig. Weitere Messungen wurden bei 30°C, in Minimalmedium und mit 2'Diaminopurin als alternativem Ligand durchgeführt. Die Enzymaktivität verdoppelte sich maximal unter allen Bedingungen in Anwesenheit des Liganden. Wie bei *add* war allerdings auch bei *pbuE* die Hintergrundaktivität ohne Ligand gegenüber dem Ausgangsplasmid erhöht. Der Einbau des Schalters in die 5'UTR erhöhte in beiden Fällen die Expression der  $\beta$ -Galactosidase. Die Genexpression konnte mit den verwendeten Schaltern nicht reprimiert werden.

### 3.3.3 2'dG-Schalter in *E. coli*

Ein weiterer Vertreter der Purin-Schalter ist *mfl* aus dem Bakterium *Mesoplasma florum*. Diese kaum erforschte Spezies wurde in den Blüten floridanischer Zitronenbäume gefunden. Durch computergestützte Auswertung von Metagenomen wurde das klassische Sekundärstruktur-Motiv der Purinaptamere identifiziert, die *three way junction*. Bislang wurde die Funktion von *mfl* nur durch *in vitro* Transkription (144) bestätigt. Es liegen keine *in vivo* Daten vor. In den *in vitro* Transkriptionsstudien wurde eine 2'dG-abhängige Repression der Transkription beobachtet. *Mfl*

## Ergebnisse

wurde aufgrund dieser Ergebnisse als transkriptioneller Aus-Schalter klassifiziert (144). Im  $\beta$ -Galactosidase-Assay wurde eine 2'dG-abhängige Repression der Reporterogenaktivität erwartet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Nach dem Vorbild der Adenin-Schalter wurde der *mfl* mit umgebendem 5'UTR in pWH948\_NheI\_AflII kloniert und die Schalteraktivität durch  $\beta$ -Galactosidase-Test in *E. coli* gemessen. Als Negativkontrolle wurde in diesem Fall *mfl* mit der Punktmutation C74A verwendet. Die Mutation führt zum Verlust der Ligandenbindung. In den Experimenten wurde ein weiteres Aptamer untersucht, das im Folgenden *hybrid*-Aptamer genannt wird. Es handelt sich um ein artifizielles 2'dG-Aptamer mit stabilisierten peripheren Elementen.

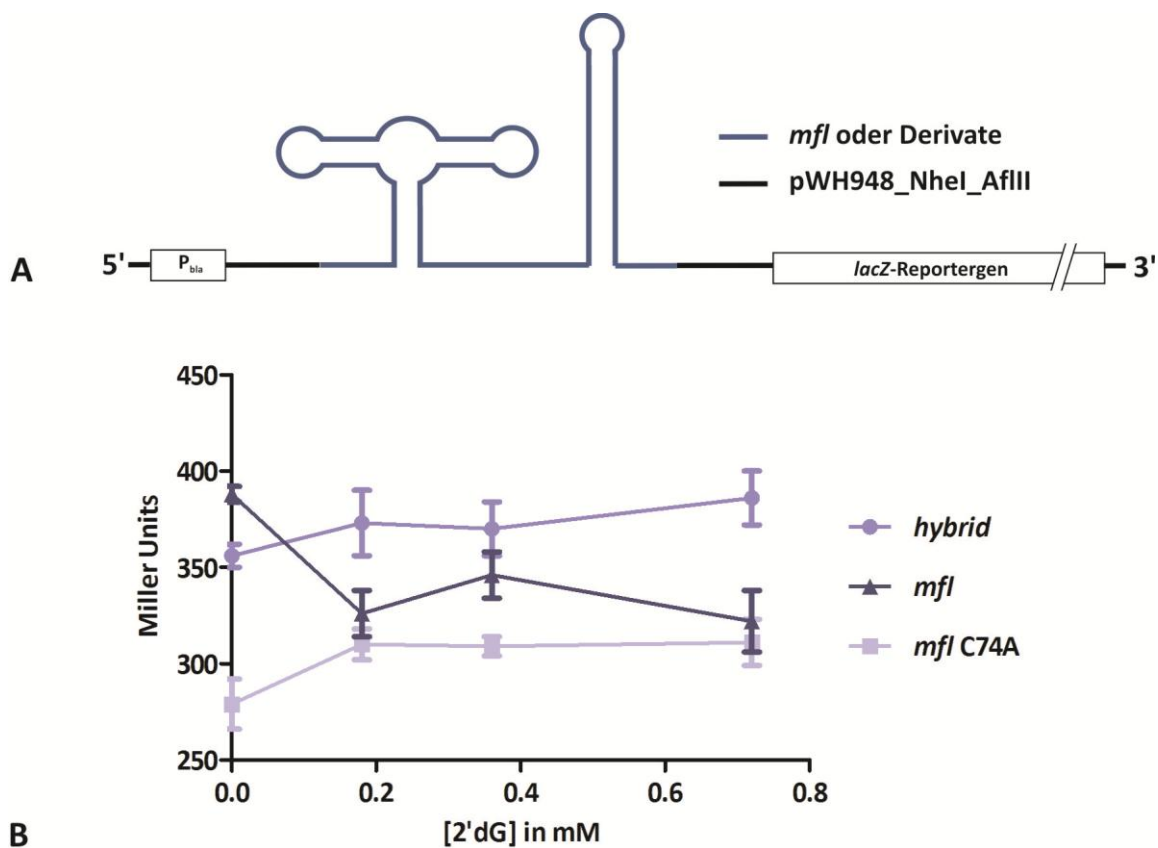


Abbildung 23 A: Design der 2'dG-Schalter Konstrukte auf Plasmid pWH948\_NheI\_AflII. B:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität der Konstrukte in Miller Units in Abhängigkeit der 2'dG-Konzentration in mM. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen.

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität der *mfl*-Konstrukte bewegte sich insgesamt zwischen 250 und 400 MU. Kein Konstrukt zeigte eine ausgeprägte 2'dG-abhängige Repression. Die Aktivitäten der Konstrukte Hybrid und C74A stiegen leicht mit der 2'dG-Konzentration. Bei dem 2'dG-Aptamer wurde eine 20%ige Repression der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei hoher 2'dG-Konzentration beobachtet. Diese Tendenz war jedoch nicht signifikant. Der Schalter konnte in dieser Form nicht zur Genregulation verwendet werden. Da in diesem System keine ausreichende Regulation vorhanden war, wurde das Schalterdesign geändert.

### 3.3.4 2'dG-Aptamere in *B. subtilis*

Das nächste Konstrukt basierte auf einem bestehendem *in vivo* RNA-Schalter-Reportersystem, in das *mfl* als Ligandenbindungsdomäne eingefügt wurde. Die Wahl fiel auf den guaninbindenden *xpt*-Schalter aus *B. subtilis*, da die Aptamerdomäne homolog zu 2'dG- und *hybrid*-Aptamer war. Der *xpt*-Schalter war ebenfalls ein transkriptioneller Aus-Schalter. Darüber hinaus wurde in *B. subtilis* bereits *xpt*-Riboswitch-Aktivität mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Assays gemessen. Das Reportersystem mit *xpt*-Schalter im 5'UTR des *lacZ*-Gens befand sich auf dem Plasmid pDG\_apt\_wt. Die Aptamerdomäne des *xpt*-Schalters wurde durch die Aptamere 2'dG, Hybrid und C74A ersetzt. Da der P1-Stamm des *xpt*-Aptamers mit der Expressionsplattform sequenzspezifisch interagiert, wurde er nicht verändert (siehe Einleitung). Die Reporterplasmide pDG\_apt\_wt und Derivate wurden spezifisch am *amyE*-Lokus ins *B. subtilis* Genom integriert. Im Gegensatz zu den plasmidständigen Reportersystemen in *E. coli* lag damit in *B. subtilis* genau eine Kopie des Reportergens pro Zelle vor. Statt LB-Vollmedium wurde CSK-Minimalmedium verwendet. Der  $\beta$ -Galactosidase-Test wurde nicht im 96-well-Verfahren sondern in Reagenzgläsern durchgeführt. Die Sauerstoffversorgung des strikt aeroben *B. subtilis* lässt sich in Reagenzgläsern besser gewährleisten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

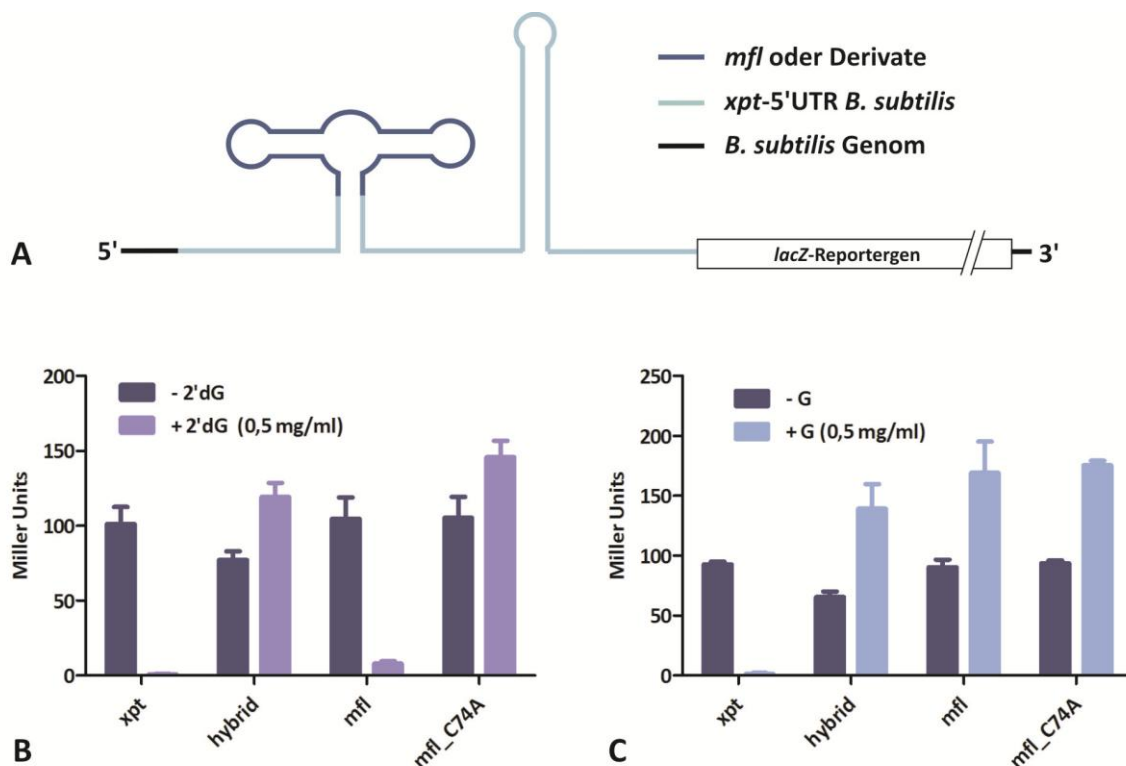


Abbildung 24 A: Aufbau des  $\beta$ -Galactosidase-Reportersystems in *B. subtilis*: B  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Miller Units. Messung in *B. subtilis* in CSK-Minimalmedium mit und ohne 0,5 mg/ml 2'dG. C:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Miller Units, mit Guanin (G) statt 2'dG als Ligand. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen.

Die Konstrukte mit *xpt*- und 2'dG-Aptamer zeigten eine starke Repression der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Anwesenheit von 2'dG. Das Ausgangsplasmid mit *xpt*-Aptamer zeigte dabei eine 100%ige

Repression, 2'dG-Konstrukt kam immerhin auf über 90% Repression. Im Vergleichsexperiment mit Guanin statt 2'dG dagegen reprimiert nur *xpt* die Aktivität in Abhängigkeit von Guanin. Hybrid und Mutante reagierten dagegen auf 2'dG und G mit einer erhöhten  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Auch das 2'dG Konstrukt zeigte eine erhöhte Aktivität unter Guanin.

Als nächstes wurde ein  $\beta$ -Galactosidase-Test mit einer 2'dG-Konzentrationsreihe durchgeführt. Hauptsächlich wurde der Test durchgeführt um eine Konzentrationsabhängigkeit der Repression des 2'dG-Schalters nachzuweisen. Außerdem wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Aktivitätszunahme bei den Konstrukten Hybrid und C74A ebenfalls untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

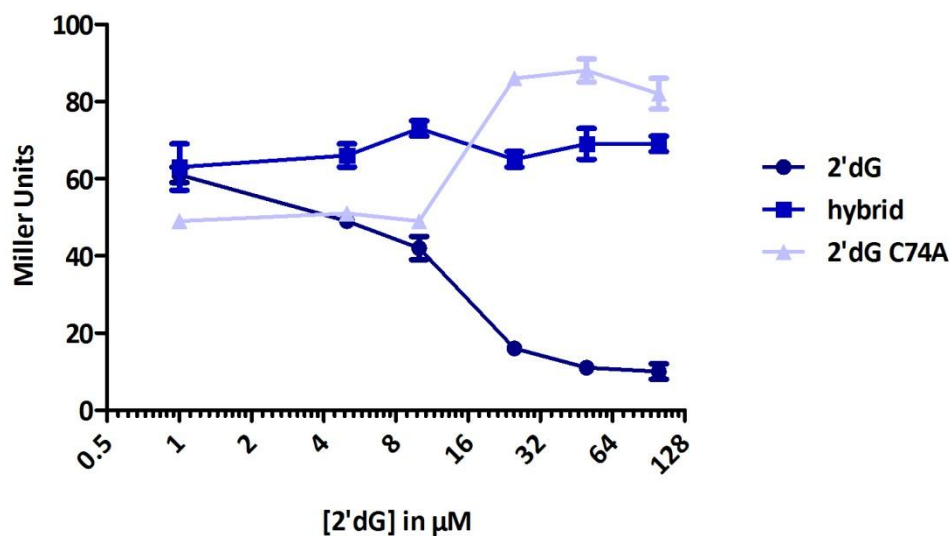


Abbildung 25  $\beta$ -Galactosidase-Assay unter einer 2'dG-Konzentrationsreihe von 1 bis 100  $\mu$ M. Aktivitäten in Miller Units. Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Der  $\beta$ -Galactosidase-Assay mit der 2'dG-Konzentrationsreihe ergab eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Repression durch das 2'dG-Aptamer-Konstrukt. Die Repression verstärkte sich von 1  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M 2'dG. Die mittlere inhibitorische Konzentration lag bei 10  $\mu$ M. Das Hybrid-Konstrukt zeigte über den gesamten Konzentrationsverlauf keine signifikante Veränderung. Die Aktivität des mutierten Konstrukts C74A lag bis 10  $\mu$ M bei 50 MU und stieg bei höheren Konzentrationen auf 80 bis 90 MU.

### 3.3.5 Zusammenfassung RNA-Schalter

In dieser Studie wurden drei natürliche RNA-Schalter und ihre Derivate auf regulatorische Aktivität in Nicht-Wirtssystemen untersucht. Der *add*-Schalter aus *V. vulnificus* regulierte in *E. coli* maximal 1,5-fach. Der Adenin-Schalter *pbuE* aus *B. subtilis* zeigte konstant eine mindestens zweifache Regulation in einem *E. coli* basierten Reportersystem. Allein die Anwesenheit beider An-Schalter in der *lacZ*-

## Ergebnisse

5'UTR verstärkte die Reportergenexpression. Sie wurde auch ohne externe Zugabe des Liganden nicht unterdrückt. Der 2'dG-Schalter aus *M. florum* wurde in *E. coli* und in *B. subtilis* eingesetzt. Im *B. subtilis* System konnte eine Ligand-induzierte 90%ige Repression der Reportergenaktivität erreicht werden. Dabei wurde die 2'dG-Aptamerdomäne des RNA-Schalters in ein funktionsfähiges *xpt*-Reportersystem eingesetzt und so ein synthetischer RNA-Schalter aus natürlichen Komponenten entwickelt.



## 4 Diskussion

### 4.1 Selex I

Die *in vitro* Selektion von RNA-Aptameren gegen die  $\beta$ -Lactamase TEM1 war die erste Protein-Selex im Frankfurter Labor der Arbeitsgruppe Süß. Trotz umfangreicher Recherche und erprobten Protokollen zu sämtlichen RNA-Arbeiten wurden während der Selektion lehrreiche Erfahrungen gesammelt. Nachdem die erste Selektion gegen TEM1 keine bindenden Aptamere generiert hatte, wurde klar, dass der Erfolg einer Selektion wesentlich von Erfahrungswerten abhängt, die nicht veröffentlicht werden. Im ersten Teil der Diskussion werden verbesserungswürdige Aspekte der ersten Selektion besprochen.

#### 4.1.1 Kontinuität

Oft wurden in der Selektion Runden wiederholt, wenn die Auswertung nicht die gewünschte Entwicklung zeigte. Wiederholungen sind einerseits wichtig im Etablierungsprozess, um ein Gefühl für die Selektionsparameter zu bekommen. Andererseits verlor die Selektion durch Variation des RNA/Protein-Verhältnis und der Pufferkonzentration in den Wiederholungen an Kontinuität. Nur zu Beginn der Selektion wurden mehrere Runden unter konstanten Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung nach jeder Runde, dabei vor allem die Elutionsfraktion der Hauptsäule, bestimmte die Strategie. Die Selektion wurde mit einer Erwartungshaltung an einen bestimmten Verlauf durchgeführt. Der Verlauf wurde als notwendig betrachtet, da er in vielen Selex-Publikationen berichtet wird. In den ersten Runden sollten die Elutionswerte gering sein und ab Runde fünf sollten sie sich spezifisch steigern. Runde sechs und sieben wurden solange wiederholt, bis sich der gewünschte Anstieg einstellte, wie in Abbildung 26 dargestellt ist. Im Nachhinein muss diese vorgeplante Strategie kritisch beurteilt werden, da sie dem Selektionsprozess zu wenig Spielraum für Eigendynamik erlaubt. Jede Selektion verläuft anders, selbst bei gleichem Ausgangspool und gleicher Zielstruktur. Die Variabilität des Pools ist zu groß um den Verlauf oder das Ergebnis einer Selektion zu planen oder vorhersagen zu können (145). Die Erwartungshaltung an einen genauen Verlauf kann in dieser Selektion zur Anreicherung von unspezifischen Sequenzen geführt haben.

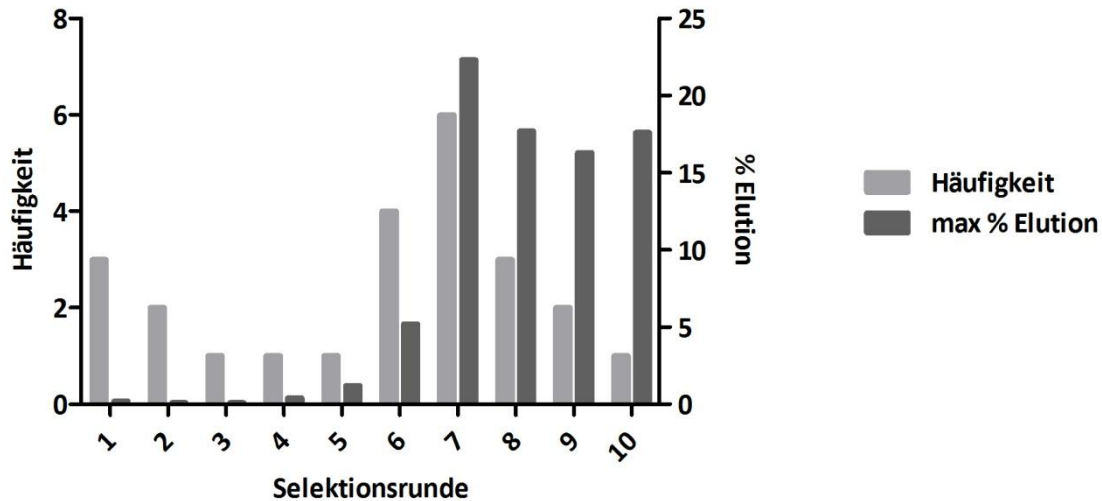


Abbildung 26: Erste Selektion: Wie oft eine Selektionsrunde durchgeführt wurde (hellgrau); und wie hoch die maximale Elution von der Hauptsäule war (dunkelgrau).

#### 4.1.2 Zeitaufwand

In das Protokoll der ersten Selektion wurde viel Zeit investiert. Jeder Selektionsrunde wurde kontrolliert, variiert und wiederholt. Zur Kontrolle der Selektion wurde ausschließlich mit radioaktiv markierten RNA-Pools gearbeitet. Einerseits konnte dadurch der Selektionsfortschritt nach jeder Runde ausgewertet werden, andererseits wurde die Selektion beträchtlich verlangsamt. Das lag nur teilweise an dem erhöhten Sicherheitsaufwand im Isotopenlabor, die ständige Auswertung selbst verlangsamte die Selektion. Außerdem wurde die Amplifikation der Pools auf Ausbeute und Reinheit optimiert. Das Protokoll für reverse Transkription, PCR und Transkription mit Aufreinigung nach jeder Reaktion dauerte dadurch zwei Tage, einer Selektionsrunde dauerte eine Woche.

Nach dem beträchtlichen Anstieg der Elutionsfraktion in Runde sieben wurde die Selektion noch mehrere Runden fortgesetzt. Insgesamt wurden bei der ersten Selektion mit Wiederholungen 23 Runden durchgeführt. Durch das umfangreiche Protokoll dauerte die Selektion ein halbes Jahr. Diese Zeit wurde investiert, da von einer spezifischen Anreicherung des Pools ausgegangen wurde. Die Auswertung des angereicherten Pools mit alternativen Methoden wie Filterretention und EMSA zeigte dann keine spezifische Aktivität gegen das Zielprotein TEM1. Dabei war die alternative Auswertung durch den Einsatz radioaktiv markierter RNA hochsensitiv und verlässlich. Trotzdem wurden etwa 40 Einzelsequenzen des Pools untersucht, in der Hoffnung, dass Sequenzen mit spezifischer Aktivität unterrepräsentiert waren. Allerdings machte die Tatsache, dass bei der sensitiven Untersuchung des angereicherten Pools gar keine spezifische Aktivität erkennbar war, den Fund einer aktiven Sequenz aus 40 unwahrscheinlich. Man musste davon ausgehen, dass es sich bei den 40 Sequenzen statistisch um die Häufigeren und eben nicht die Unterrepräsentierten handelte.

#### 4.1.3 Unspezifische Anreicherung

Was führte zur Anreicherung von unspezifischen Sequenzen in einem Selex-Pool? Unspezifische Sequenzen konnten entweder während der Selektion oder der Amplifikation angereichert werden. Die Amplifikation wurde nach erprobten Laborstandards durchgeführt. Der RNA-Pool wurde über denaturierende PAGE aufgereinigt, sodass die Homogenität der Poolbanden nach der Transkription im Gel kontrolliert wurde. Die Aufreinigungen und Gelkontrollen zwischen den Amplifikationsreaktionen haben während der Selektion die eine einheitliche Sequenzlänge der Pools sichergestellt. Sichtbare Amplifikationsartefakte traten nicht auf. Dass trotzdem manche Sequenzen bevorzugt amplifiziert werden, kann nicht verhindert werden, wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde. Mögliche Fehler sind also eher in der Selektion zu suchen.

Eine Möglichkeit zur Vermeidung unspezifischer Sequenzen besteht in einer alternativen Elutionsmethode. Statt unspezifisch mit Harnstoff zu eluieren, hätte mit einer konzentrierten TEM1-Lösung spezifisch eluiert werden können. Diese Möglichkeit wurde während der Selektion diskutiert, aber wegen eines zu hohen Proteinverbrauchs als nicht realisierbar erachtet. Im Nachhinein erweist sich dieses Argument nicht als stichhaltig. Der Proteinverbrauch wäre zwar tatsächlich hoch gewesen, das Protein hätte aber in ausreichenden Mengen produziert werden können. Auch der Bedarf für eine Elution wäre geringer als zunächst angenommen. Ein Säulenvolumen der TEM1-Lösung wäre für die Inkubation auf der Säule ausreichend gewesen. Die Säule hätte nicht mit mehreren Säulenvolumen einer TEM1-Elutionslösung gewaschen werden müssen, wie bei einer Harnstoff-Elution.

Die Harnstoff-Elution brachte einige Nachteile mit sich. Durch die denaturierende Wirkung des Harnstoffs wurde die Säule durch die Elution so gut wie vollständig von RNA gereinigt. Egal durch welche Wechselwirkungen die RNA das Waschen der Säule überstanden hatte, durch Harnstoff wurde sie eluiert. Dabei ist es möglich, dass RNA-Spezies neben dem Protein auch das Säulenmaterial oder die Gefäßwand binden (*coating*). Um diese unspezifischen Bindungsreaktionen zu verringern, hätte man während der Inkubation des RNA-Pools auf der Säule *blocking*-Reagenzien einsetzen können. Dazu eignen sich wie bei *blot*- oder *elisa*-Techniken BSA, RNase-freies Milchpulver (I-Block) oder in diesem Fall tRNA. Während der Selektion jedoch wurde nicht von solchen Säulen- oder Plastikbindern ausgegangen, da in jeder Selektion eine negative Selektion in Form einer Vorsäule durchgeführt wurde. Dabei zeigten die angereicherten Pools eine deutlich stärkere Elution von der Hauptsäule als von der Vorsäule. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die unspezifisch angereicherten Sequenzen TEM1-unabhängig die Säule binden. Siehe hierzu auch die Säulenchromatographie der Einzelsequenzen in Abbildung 13C.

#### 4.1.4 Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose

Als negativ für den Verlauf der gesamten Selektion könnte sich eine Entscheidung in einer frühen Phase herausstellen: Die Kopplung des Proteins TEM1 an CNBr-aktivierte Sepharose. Die Kopplungsreaktion wurde streng nach Herstellerangaben durchgeführt und erfolgte beinahe vollständig. Die eingesetzte Menge TEM1 war beinahe komplett an die Säulenmatrix gebunden. Die katalytische Aktivität von gekoppelter TEM1 auf der Säule betrug jedoch nur noch 1% im Vergleich zum freien Protein. Es wurde davon ausgegangen, dass das Protein zwar in seiner katalytischen Aktivität eingeschränkt, jedoch nicht in seiner strukturellen Integrität beeinträchtigt war. Daher wurde die Selektion gestartet. Nach Abschluss der Selektion erhielten wir den Hinweis, bei CNBr-aktiverter Sepharose nicht nach Herstellerangaben zu koppeln (10). Die Kapazität der Sepharose sei so hoch, dass ein Vielfaches der Proteinmenge gebunden werden kann, die für die Selektion eingesetzt wird. Bei geringen Proteinmengen würde ein Protein nicht einmal, sondern vielfach gebunden, was zur Denaturierung führen kann. Es wurde empfohlen, die Aktivität der Sepharose vor der Protein-Kopplung durch Hydrolyse zu reduzieren. Dadurch würden Zielproteine weniger oft, im besten Fall nur einmal gebunden. Eine alternative Strategie wäre, den RNA-Pool mit freiem nativen TEM1 zu inkubieren und erst danach über eine CNBr-aktivierte Säule die RNA-Protein-Komplexe herauszufiltern (146).

## 4.2 Selex II

Die zweite Selektion griff die Erfahrungen der Ersten auf. Das Protokoll wurde gestrafft, sodass die gesamte Selektion nur eine Woche dauerte. Die Selektion wurde mittels Streptavidin-beschichteter magnetischer *beads* durchgeführt, an die biotinyliertes Zielprotein immobilisiert war. Die Zielproteine wurden nicht mehr kovalent an die Matrix gebunden und blieben aktiv. Die Inkubation von RNA-Pool mit Zielprotein wurde in Anwesenheit von BSA durchgeführt, um *coating*-Effekte zu verringern. Erst nach Abschluss der Selektion wurden einzelne Runden ausgewertet. Es wurde nicht mehr versucht, die Selektion eines Aptamers gegen TEM1 zu erzwingen. Ein neuer Aspekt der Selex wurde berücksichtigt, nämlich wie geeignet ein Protein für eine Aptamer-Selektion ist. In Veröffentlichungen zum Thema Selex liest man mantraartig: „Durch künstliche Selektion können Aptamere gegen praktisch jede Zielstruktur generiert werden“. Diese Aussage ist nicht falsch, da lange Listen erfolgreicher Selektionen gegen verschiedenste Zielstrukturen veröffentlicht sind (3). Wie hoch ist aber die Wahrscheinlichkeit, gegen ein beliebiges Protein ein Aptamer zu generieren?

### 4.2.1 Aptamerogenität

Ob ein Protein geeignet für eine Aptamerselektion ist, kann im Vorfeld der Selektion nicht beurteilt werden. Man kann spekulieren, dass Proteine mit Nukleinsäure-bindender Domäne für die Selektion geeignet sind. Weiterhin scheint es von Vorteil, wenn die Proteinoberfläche unter physiologischen

Bedingungen positiv-geladen ist. Generell gesagt könnte ein basischer pl die Chance auf eine erfolgreiche Selektion erhöhen. Ein pl unter 7 schließt jedoch eine erfolgreiche Selektion nicht aus, da spezifische RNA-Protein Bindungen nicht nur auf ionischen Wechselwirkungen beruhen. Wie hoch die Wahrscheinlichkeit für die Generierung eines RNA-Aptamers gegen ein beliebiges Zielprotein ist, variiert. In der Literatur findet man eine Schätzung von 75% (147), ein persönlicher Erfahrungsbericht gab eine Erfolgsquote von maximal 25% an. Dabei ist auch der initiale Pool mitentscheidend. Eine RNA-Selektion wird vermutlich höhere Erfolgsaussichten haben als eine DNA-Selektion, da die zusätzliche OH-Gruppe der RNA komplexere Faltungs- und Interaktionsmöglichkeiten bietet. Die Erfolgchancen können darüber hinaus durch den Einsatz chemischer Modifikationen gesteigert werden. In einem privatwirtschaftlichen Großprojekt wurden Selektionen mit modifizierter DNA gegen 1428 humanen Proteinen selektiert (92). Davon konnten Aptamere mit nanomolarer Affinität gegen 1204 Proteine selektiert werden. Die Erfolgswahrscheinlichkeit kann also durch chemische Modifikation auf über 80% angehoben werden. Bei einer Protein-Selex mit unmodifizierter RNA muss von einer geringeren Erfolgswahrscheinlichkeit ausgegangen werden, noch vor den diskutierten Verbesserungen zur Selektionsmethodik. Daher wurde in der zweiten Selex gegen mehrere klinisch relevante Zielproteine selektiert, um die Wahrscheinlichkeit für mindestens eine erfolgreiche Selektion zu verbessern. Tatsächlich verlief erst die Selektion gegen das vierte Zielprotein NDM1 erfolgreich.

### 4.2.2 NDM1-Selektion

Die Selektion gegen NDM1 reicherte nach neun Runden einen spezifisch-bindenden RNA-Pool an. Die Filterretention zeigte allerdings keine Bindung des Pools bei niedrigeren Konzentrationen des Proteins als 1  $\mu\text{M}$ . Maximal waren in der Filterretention 5% der radioaktiv markierten RNA an NDM1 gebunden. Dieser Wert ist vergleichsweise niedrig, bei anderen Selektionen binden angereicherte Pools mit mindestens 20% (12,148). Dennoch war die Bindung nachweislich abhängig von der NDM1-Konzentration, was ein deutliches Zeichen einer spezifischen Interaktion ist. Der  $K_D$ -Wert lässt sich grob auf einen Bereich von  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M einschränken. Die Bindung des Pools zum Protein ist also spezifisch, aber nicht sehr stark. Andere Aptamere binden ebenfalls im hohen nanomolaren Bereich (148). Durch den hohen  $K_D$  konnte die Bindung durch Heparin beinahe komplett unterbunden werden. Heparin ist stark negativ geladen und bindet somit durch ionische Wechselwirkungen an positiv geladene Proteinoberflächen. Da der RNA-Pool durch Heparin von NDM1 verdrängt werden konnte, werden ionische Wechselwirkungen auch für die RNA-NDM1-Bindung wichtig sein. Festere Aptamer-Ligand-Bindungen definieren sich dagegen stärker über nichtionische Wechselwirkungen kürzerer Reichweite. Verschiedene Versuche zur Verbesserung der Bindung wurden daher unternommen.

Die Optimierung der Bindung durch weitere Selektionen war allerdings nicht möglich. Sowohl die Fortsetzung als auch die Wiederholung der Selektion konnten das Ergebnis nicht verbessern. Es wurde auch der Versuch einer Selex mit spezifischer Elution unternommen. Dabei wurde nicht die Biotin-Bindung gelöst, sondern durch Inkubation mit 1 mM Ampicillin eluiert. Der hohe Überschuss des NDM1-Substrats Ampicillin sollte durch Interaktion mit dem aktiven Zentrum genau die RNA-Sequenzen verdrängen, die dort gebunden waren. Dadurch sollte spezifisch auf Bindung an das aktive Zentrum und somit auch auf Inhibition selektiert werden. In der Selektion wurden allerdings keine NDM1-Binder, oder Inhibitoren angereichert. Zwei mögliche Gründe werden diskutiert. Erstens ist Ampicillin kein optimaler Eluent, da es durch NDM1 abgebaut wird. Der hohe Überschuss Ampicillin sollte eine ausreichende Konzentration zur Elution gewährleisten. Die Elution mit einem Inhibitor wäre dennoch wirkungsvoller gewesen. Die einzigen bekannten Inhibitoren von NDM1 sind allerdings im Moment Chelatoren wie EDTA. Damit zu eluieren wäre jedoch nicht spezifisch, da die 3D-Strukturen der RNA oftmals durch zweiwertige Metallionen wie  $Mg^{2+}$  stabilisiert werden (8,19,59). Die Zugabe eines Chelators hätte zur unspezifischen Elution aller RNA-Spezies geführt, deren Faltung  $Mg^{2+}$ -abhängig war. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die besten Inhibitoren nicht vom aktiven Zentrum verdrängt und dadurch auch nicht eluiert wurden. Möglicherweise war Ampicillin als Eluent zu schwach, um die besten Inhibitoren anzureichern.

### 4.2.3 Inhibitions-Selex

Der Gedanke einer direkten Selektion von Inhibitoren bestand seit Beginn der Arbeit. Parallel zu den rein auf Bindung ausgelegten Selektionen wurde über mögliche Selex-Varianten nachgedacht, die auf Proteininhibition selektieren. Die direkteste Lösung wäre die Elution mit einem Inhibitor, wodurch RNA-Spezies eluiert werden, die ein ähnliches Epitop wie der Inhibitor binden. Im Fall der Selektion gegen TEM1 wäre das  $\beta$ -Lactamase inhibierende Protein (BLIP) geeignet gewesen. Da allerdings gegen TEM1 noch nicht einmal Binder selektiert werden konnten, wurde auch keine Inhibitions-Selex mehr durchgeführt. Für  $\beta$ -Lactamasen ohne bekannten Inhibitor müsste die Enzymreaktion konditional in die Selektion eingebunden sein. Dabei sollte so selektiert werden, dass Aptamere umso stärker angereichert werden, je besser sie inhibieren.

Die Suche nach einer Inhibitions-Selex wurde zu Gunsten des neuen Selektionsprotokolls aufgegeben, dessen Vorteil die hohe Geschwindigkeit war. Die inhibitorischen Eigenschaften der bindenden Spezies wurden im Anschluss charakterisiert. Eine Inhibitions-Selex kann darüber hinaus überflüssig sein, da auf Bindung selektierte Aptamere oft die Funktion des Zielproteins beeinflussen. Nach der Hypothese des *homing principle* binden Aptamere bevorzugt an das aktive Zentrum von Proteinen (72). Die höhere Dichte funktionaler Gruppen im aktiven Zentrum soll die Aptamer-Bindung begünstigen. Andererseits kann auch die Topologie der Proteinoberfläche der Grund für das

*homing principle* sein. Da aktive Zentren meist in Spalten oder Vertiefungen liegen, können Aptamere dort mehr Kontakte zum Protein ausbilden und fester binden als auf einer planen Oberfläche. Auch bei den  $\beta$ -Lactamasen liegt das aktive Zentrum an der Schnittstelle oder Spalte zwischen zwei Domänen (149).

#### 4.2.4 Einzelsequenzanalyse

In der Einzelsequenzanalyse wurden NDM1-bindende Sequenzen gefunden. Dabei zeigten alle NDM1-Binder eine inhibitorische Wirkung, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die *homing principle* Hypothese hat sich in dieser Arbeit bestätigt. Der beste Binder und Inhibitor war die Sequenz D909, die einen ähnlichen  $K_D$  wie der Pool zeigte. Sowohl in der TEM1- als auch in der NDM1-Selex waren die Bindungseigenschaften der Einzelsequenzen nicht besser als die des Pools. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass einzelne Sequenzen besser als der Pool binden. Wenn aber der Pool selbst nur schwach oder gar nicht bindet, sollte man nicht erwarten, stark bindende Aptamere im Pool zu finden.

Wenn man Aptamere im Pool identifizieren will, die über die Bindung hinaus noch andere Funktionen besitzen, bietet sich ein Screening an (39,150). Bei der Entwicklung des TetR-bindenden Aptamers beispielsweise wurde im Anschluss an die *in vitro* Selektion ein *in vivo* Screening durchgeführt. Das Screening beruhte auf einem  $\beta$ -Galactosidase-Reportergenassay in *E. coli*. Es wurde nach Aptameren gescreent, die die reprimierende Wirkung von TetR auf die  $\beta$ -Galactosidase Expression aufheben (9). Ein Screening des Pools auf die besten Inhibitoren von NDM1 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Stattdessen wurden die NDM1-Binder auf NDM1-Inhibition in einem photometrischen Aktivitätstest untersucht. Ein *in vivo* basiertes Screening der inhibierenden Aptamere nach Vorbild des TetR-Aptamers wäre möglich gewesen. Dazu müsste man den Aptamer-Pool in NDM1-positiven *E. coli* coexprimieren. Beim Wachstum auf Festmedium wird nach Kolonien gescreent, die durch Aptamerexpression  $\beta$ -Lactam sensitiv werden. Durch Sequenzierung können die NDM1-inhibierenden Aptamere aus den sensitiven Kolonien identifiziert werden. Der Vorteil des *in vivo* Screenings ist, dass mit wenig Aufwand viele Kandidaten gleichzeitig ausgewertet werden können. Gleichzeitig wird die Inhibition im Zielorganismus gemessen, die biologische Aktivität des Inhibitors.

#### 4.2.5 D909 doped Selex

Statt einem *in vivo* Screenings des D9-Pools wurde zunächst versucht, die NDM1-Bindung durch eine *doped* Selex auf der Basis von Sequenz D909 zu verbessern. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Steigerung der Bindungseigenschaften eingesetzt (148). Der initiale Pool bestand aus Sequenzen, deren randomisierter Bereich zu 80% mit D909 identisch war. Der Pool deckte den Sequenzraum um D909 bis zu einer Entfernung von durchschnittlich 10 Mutationen pro Sequenz ab. Im Selektionsverlauf steigerte sich die NDM1-Spezifität des Pools bis zur vierten Runde, wurde jedoch

nicht besser als D909. Nach Runde vier nahm die NDM1-Spezifität wieder zu Gunsten unspezifischer Anreicherungen ab. Die Abnahme einer bereits etablierten Spezifität im Pool wurde bereits häufiger beschrieben (12,19). Es wird diskutiert, dass der Einfluss der Amplifikation auf die Zusammensetzung des Pools mit jeder Selektionsrunde zunimmt. In späten Runden werden dadurch Amplifikationsartefakte wahrscheinlicher. Treten sie einmal auf, dauert es nur wenige Runden, bis sie den Pool dominieren. Aus diesem Grund plädieren manche Gruppen für kurze Selektionen mit wenigen Runden (33,34). Die NDM1-Bindung konnte durch die *doped* Selex nicht gegenüber D909 verbessert werden. Anscheinend bildet D909 in Bezug auf die NDM1-Bindung ein lokales Maximum im Sequenzraum. Daher wurden weitere Untersuchungen auf D909 konzentriert.

### 4.2.6 D909 Minimalmotiv

Durch die Untersuchung verkürzter Versionen von D909 sollte der NDM1-Bindebereich eingegrenzt werden. Die Verkürzung wurde in 10 nt Schritten von 5'- und 3'-Richtung durchgeführt. Obwohl bei keinem Verkürzungsschritt ein totaler Bindungsverlust eintritt, konnten doch stufenweise Abnahmen der Bindungsstärke mit zunehmender Verkürzung beobachtet werden. Der Verlust eines 8 nt langen Bereichs führte bei Verkürzungen von beiden Seiten zu einem deutlichen Abfall der NDM1-Bindung. Um den Bereich weiter einzugrenzen sind zusätzliche Messungen notwendig. Das Ziel ist die Bestimmung eines möglichst kurzen Minimalmotivs, das immer noch an NDM1 bindet. Das 8 nt lange Motiv liegt in D909 im Stamm einer Stamm-Schleife vor, der im Bereich des Motivs ausgebuchtet ist. In verkürzten Versionen liegt das Motiv ungefaltet vor und zeigt immer noch Bindung. Falls eine Faltung nicht essentiell für die Bindung des Proteins sein sollte, ist es möglich, dass das Minimalmotiv auf 8 nt eingegrenzt werden kann. Das Molekulargewicht dieses Octanukleotids beträgt weniger als 3 kDa, was in Bezug auf therapeutische Eigenschaften Vorteile gegenüber langen Aptameren hat. Das Octanukleotid könnte aufgrund seiner geringen Größe einfacher über die äußere Membran gramnegativer Bakterien in den periplasmatischen Raum gelangen. Die Produktion wäre erheblich günstiger. Chemische Modifikationen zur Stabilisierung könnten ohne Rücksicht auf Sekundär- und Tertiärstrukturen vorgenommen werden.

### 4.2.7 D909 inhibiert NDM1

Die NDM1-Aktivität konnte durch D909 inhibiert werden. D909 zeigte bessere inhibitorische Eigenschaften als die anderen NDM1-Binder D918 und D920. Die wiederum inhibierten stärker als der Pool D9. Im Gegensatz zur Bindung definierte der Pool nicht die maximale Inhibition. Die bindenden Einzelsequenzen inhibierten stärker. Für die Inhibitionstests waren hohe Mengen an RNA notwendig, um einen inhibitorischen Effekt zu erreichen. Zunächst wurde das auf den hohen  $K_D$ -Wert der RNA zu NDM1 zurückgeführt. Dennoch konnte mit D909 eine konzentrationsabhängige Inhibition



der NDM1-Aktivität nachgewiesen werden. Die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion ging mit steigender D909-Konzentration zurück.

Es trat noch ein weiterer Inhibitionseffekt auf. Nach einem zunächst linearen Anstieg stagnierte die Produktkonzentration bevor das Substrat vollständig umgesetzt war. Die Enzymreaktion brach scheinbar ab und blieb dauerhaft unterbunden. Auch nach 24 h war kein weiterer Produktanstieg messbar. Eine mögliche Erklärung wäre eine permanente Inhibition von NDM1 durch D909. Dabei ist nicht erklärbar, warum die Stagnation der Reaktion erst nach etwa einer Stunde Reaktionszeit auftrat, da D909 mit NDM1 vorinkubiert worden war. In einer noch unveröffentlichten Studie zu niedermolekularen Inhibitoren von NDM1 berichtete Franca Klingler (Uni Frankfurt, Institut für pharmazeutische Chemie) vom gleichen Phänomen im Nitrocefintest. Die Stagnation der Enzymreaktion ist also kein rein RNA-abhängiger Effekt, sondern liegt eventuell an NDM1 oder dem Substrat Nitrocefin. Frau Klingler berichtete, dass sie diesen Effekt im Inhibitionstest mit dem Substrat Imipenem nicht beobachtet hatte.

Bei der Beurteilung der Inhibition ist die Wahl des Substrats also von großer Bedeutung. Der  $K_M$ -Wert von Nitrocefin für NDM1 liegt im Bereich von 2  $\mu\text{M}$  (151). In die Tests wurden 100  $\mu\text{M}$  Nitrocefin eingesetzt, was erklärt, warum hohe Konzentrationen zur Inhibition notwendig waren. Der inhibitorische Effekt wäre wahrscheinlich bei niedriger Substratkonzentration im Bereich des  $K_M$ -Werts besser messbar. Dann wäre allerdings die Substratkonzentration zu gering, um den Reaktionsverlauf photometrisch genau zu verfolgen. Ein alternatives Substrat wäre Ceftazidim, das zu NDM1 einen deutlich schlechteren  $K_M$ -Wert von 181  $\mu\text{M}$  besitzt (130). Allerdings absorbiert Ceftazidime wie RNA maximal bei 260 nm (152), sodass die Substratkonzentration nicht unabhängig vom Inhibitor gemessen werden kann. Das gleiche gilt für Imipenem und die meisten Cephalosporine, deren Absorptionsmaxima im Bereich der Absorption von RNA liegen. Brauchbare Alternativen könnten die chromogenen Cephalosporine Centa (153) oder Padac (154) sein, deren Absorptionsmaxima durch  $\beta$ -Lactamaseverdau von 340 nm nach 405 nm respektive von 465 nm nach 570 nm verschoben werden. Beide Substrate wurden jedoch noch nicht an NDM1 getestet und  $K_M$ -Werte sind nicht bekannt. Der Inhibitionstest sollte an weiteren Substraten durchgeführt werden, um die inhibitorische Wirkung von D909 und dessen Derivaten besser zu charakterisieren.

Bestätigen sich die bisherigen Ergebnisse, sollten stabilisierte Varianten von D909 hergestellt werden. Damit kann untersucht werden, ob NDM1-positive *E. coli* durch den Inhibitor D909  $\beta$ -Lactam-sensitiv werden. Alternativ zur Therapie könnte D909 in einem Aptamer *displacement assay* zum screenen von Inhibitorbibliotheken verwendet werden (155). Mit dieser Studie zur RNA-basierten Inhibition von NDM1 wurde der Grundstein für neue Therapieansätze zur Bekämpfung multiresistenter Bakterien gelegt. Im ständigen Wechsel neuer Antibiotikatherapien und darauf

folgender evolutiver Entwicklung einer Resistenz bietet die RNA-Aptamers Selektion einen Vorteil zu anderen Stoffgruppen: Den evolvierenden Krankheitserregern wird durch die *in vitro* Selektion eine ebenso evolutive Antibiotika-Entwicklung entgegengesetzt.

### 4.3 Heterologe Expression von RNA-Schaltern

Natürliche RNA-Schalter aus exotischen Bakterienarten wurden in Laborstämmen zur Metabolit-gesteuerten Genregulation exprimiert. Es wurden die Adenin-bindenden An-Schalter *add* und *pbuE*, sowie der 2'-Deoxyguanosin bindende Aus-Schalter *mfl* und seine Derivate verwendet. Die RNA-Schalter wurden in der 5'UTR des *lacZ*-Reportergens exprimiert, die Schalterwirkung wurde durch Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt.

#### 4.3.1 Adeninabhängige Schalter

Der *add*-Schalter zeigte in *E. coli* nur geringe Aktivität. *Add* stammt aus *V. vulnificus*, das näher mit *E. coli* verwandt ist als *B. subtilis*. Daher wurde erwartet, dass *add* besser auf *E. coli* übertragbar ist als *pbuE*. Es wurden verschiedene Faktoren untersucht, warum *add* nur marginale Schalterfunktion zeigte. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass im LB-Medium genug Adenin vorhanden war, um den Schalter in An-Position zu halten. Ein Wechsel zu M9-Minimalmedium brachte jedoch keine Verbesserung. Faltungsstudien mit RNAfold (156) stimmten mit dem Ergebnis der Reportergentests überein, dass die An-Stellung des Schalters in unserem Plasmid schon ohne Adenin bevorzugt ausgebildet wurde. RNAfold sagte außerdem voraus, dass sich durch Addition des natürlichen Kontexts die Aus-Stellung favorisiert ausbilden würde. Es wurden neue Konstrukte kloniert, bei denen 5' und 3' des Schalters Sequenzen aus dem genomischen Kontext eingefügt wurden. Durch diese Maßnahme konnte mit dem Konstrukt *20add9* eine geringe Schalteraktivität erzielt werden. Die Temperaturabhängigkeit des *add*-Schalters war der letzte Faktor, der untersucht wurde. Da *V. vulnificus* ein Temperaturoptimum von 20°C hat, wurden für den Reportergentest Kulturen bei 20°C aber auch 28°C angezogen. Durch die niedrige Temperatur sollte die Flexibilität der Sequenz eingeschränkt und die Aus-Konformation angereichert werden. Jedoch konnte auch so die Aktivität des Schalters nicht verbessert werden. Als pragmatische Alternative bot sich *pbuE* an. Mit *pbuE* konnte eine verbesserte Genregulation erzielt werden ohne unter erhöhten Sicherheitsbedingungen in *V. vulnificus* die Funktion von *add* zu untersuchen. *PbuE* zeigte eine Regulationsstärke mit dem Faktor zwei bei allen getesteten Versuchsbedingungen in Vollmedium. Der Regulationsfaktor ist vergleichbar mit einer publizierten Studie (143). Bei Arbeiten zum Adenin-Exporter PbuE hatte die Gruppe den Transkriptionsstart des *pbuE*-Gens aufgeklärt und die Aktivität des *pbuE*-Schalters in *E. coli* beschrieben.

Das RNA-Schalter/Reportergensystem war die Grundlage für ein Projekt zur Generierung synthetischer RNA-Schalter mit neuer Ligandenspezifität. Dabei sollten die RNA-Schalter ausschließlich *in vivo* selektiert und die *in vitro* Selektion übersprungen werden. Das Selektionsprinzip wurde von Yokobayashi *et al.* übernommen (157). Der Selektionsmarker *tetA*, der für einen Tetrazyklinexporter codiert, wurde unter die Kontrolle des *pbuE*-Schalters gesetzt. Das Resistenzgen sollte ligandenabhängig exprimiert werden, um so auf funktionale Schalter zu selektieren. Die Bindungsdomäne von *pbuE* sollte randomisiert werden, um auf Aptamerdomänen zu selektieren, die alternative Liganden binden. Der regulatorische Faktor des *pbuE*-Schalters war allerdings zu gering, um durch die Zugabe von Adenin eine Tetrazyklin-Resistenz zu erreichen. Die erhöhte Grundaktivität von *tetA* unter Kontrolle des Schalters führte dazu, dass die Zellen immer eine ausreichende Resistenz gegen Tetrazyklin besaßen, unabhängig vom Liganden. Da keine ausreichende Schalteraktivität mit *pbuE* erreicht werden konnte, wurde das Projekt nicht fortgesetzt.

Mittlerweile wurde eine Studie zu genau diesem Thema veröffentlicht (158). Der *add*-Schalter konnte funktional in *E. coli* eingesetzt werden und zeigte eine über 10-fache regulatorische Aktivität. *Add* wurde randomisiert und *in vivo* auf Bindung alternativer Liganden selektiert. In der Studie konnte auf der Basis von *add* der synthetische Schalter M6 generiert werden, der nicht mehr Adenin, sondern das Pyrimidin-Derivat Ammelin spezifisch bindet. Dabei erzielt M6 ebenso eine 10-fache regulatorische Aktivität.

Warum funktionierte der *add* Schalter in der genannten Studie besser? Die Gruppe verwendete ebenfalls *E. coli* (ohne Angabe des Stammes), Kulturen wurden ebenfalls bei 37°C in LB- oder M9-Medium angezogen. *Add* wurde ohne nativen Sequenzkontext in den 5'UTR von Resistenzmarkern oder Reportergenen kloniert. Als Reporter wurde allerdings eGFP statt  $\beta$ -Galactosidase verwendet. Die Auswertung von eGFP ist einfacher, da die Zellen in 96-well Platten angezogen wurden und die Fluoreszenz direkt durch einen Plattenleser detektiert werden konnte. Der  $\beta$ -Galactosidase-Test ist zwar aufwendiger in der Durchführung, aber auch sensitiver. Einerseits weil nicht das Enzym, sondern das Produkt der Enzymreaktion gemessen wird, andererseits weil die Eigenfluoreszenz von *E. coli* den Hintergrund bei der eGFP-Messung erhöht (11). Als Selektionsmarker wurden nicht Tetrazyklin-, sondern Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenzen verwendet. Weiterhin wurde der induzierbare *lac*-Promotor statt des konstitutiven *bla*-Promotors verwendet. Die Expression des *add*-kontrollierten Gens wurde erst in der Hauptkultur induziert. Dadurch konnte die Schalteraktivität exakter kontrolliert werden. Dennoch sollten die Wahl der Reporter- und Resistenzgene sowie des Promotors nicht ausschlaggebend für die Funktion von *add* in *E. coli* sein.

Entscheidender erscheint die Expressionsstärke des Konstrukts in der Zelle. Als Vektor wurde pMod3 (Epicentre Biotechnologies) verwendet. Das *add*-kontrollierte Genkonstrukt wurde auf pMod3 in ein

Transposon eingebettet, das nach Transformation in *E. coli* genomisch integriert wird. Die Schalteraktivität wurde dadurch mit einer DNA-Kopie von *add* pro Zelle gemessen. Das Plasmid pWH948\_*add*, das in dieser Arbeit verwendet wurde, integriert nicht ins Genom und liegt als *high copy* Plasmid mit etwa 300 Kopien pro Zelle vor. Die Konzentration der RNA-Schalter war in dieser Arbeit um ein vielfaches höher als bei der veröffentlichten Studie. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sowohl die An- als auch die Aus-Konformation des Schalters populierte wird. Als Folge werden regulatorische Effekte unscharf. Durch die genomische Integration des Reportersystems wird ein höheres Effektor/Schalter Verhältnis erreicht, was zu einer präziseren Regulation führt. Der Purinschalter *mfl* zeigte in dieser Arbeit ebenfalls erst durch genomische Integration eine ausgeprägte regulatorische Aktivität.

### 4.3.2 2'dG-abhängige Schalter

Der 2'dG-abhängige Schalter *mfl* wurde nach dem Vorbild von *pbuE* in die 5'UTR eines Plasmidständigen LacZ-Gens kloniert. Ähnlich wie bei den Schaltern *pbuE* und *add* zeigte *mfl* in diesem System nur geringe regulatorische Aktivität. Die *mfl*-Aptamerdomäne wurde daraufhin in den homologen Guanin-Schalter *xpt* eingesetzt, da dieser in einem Reportergentest regulatorisch aktiv war (53). Dadurch konnte die Ligandenspezifität des RNA-Schalters von Guanin nach 2'dG verändert werden. Es wurde ein funktionaler 2'dG-Schalter in *B. subtilis* etabliert, dessen regulatorische Aktivität vergleichbar mit dem Wildtyp Guanin-Schalter *xpt* war.

Die Ligandenspezifität der Schalter *mfl* und *xpt* unterscheidet sich. Während *xpt* mit den Liganden Guanin und 2'dG aktiviert wird, reagiert *mfl* nur auf 2'dG. Die Ergebnisse des Reportergentests korrelieren dabei mit einer NMR-basierten Studie von *mfl* und *xpt* (66). Die NMR-spektroskopischen Daten wurden von Anna Wacker erhoben, mit der das 2'dG-Projekt in Kooperation durchgeführt wurde. Durch NMR konnte die Bindung der isolierten Aptamerdomänen beider Schalter von *xpt* zu Guanin und 2'dG, von *mfl* aber lediglich zu 2'dG nachgewiesen werden. Sowohl auf struktureller Ebene durch NMR und auf funktionaler Ebene im Reportergentest zeigte *xpt* das promiskuitivere Bindungsverhalten gegenüber *mfl*. Dieses Ergebnis war aus struktureller Sicht nicht erwartet worden. In der Bindungstasche bildet Guanin Wasserstoffbrücken-Bindungen zu vier Nukleotiden von *xpt* aus. Die sogenannte N3/N9-Seite von Guanin interagiert über Wasserstoffbrücken mit dem Nukleotid U51. Die Position U51 wird daher als Diskriminator gegen N9 substituierte Purine wie Nukleoside beschrieben (159) und ist in der *mfl*-Aptamerdomäne durch C ersetzt, das keine Wasserstoffbrücke mehr zu N9 ausbilden kann. Daher sollte *xpt* eigentlich eine höhere Ligandenspezifität als *mfl* aufweisen. Obwohl noch nicht gänzlich auf molekularer Ebene geklärt, wird eine biologische Relevanz der Daten diskutiert. Die Differenzierung zwischen Guanin und 2'dG muss für *mfl* strenger kontrolliert sein, da die intrazelluläre Konzentration von 2'dG deutlich niedriger ist, als die von

Guanin. Intrazelluläre Konzentrationen sind zwar Schätzungen, doch der Unterschied ist deutlich. In einer Studie zu Metabolitkonzentrationen in *E. coli* wurden 0,2 mM Guanin und nur 0,5  $\mu$ M 2'dG gefunden (160). *Xpt* braucht in der Zelle nicht gegen 2'dG zu diskriminieren, weil ein Zusammentreffen viel zu selten ist. Wird 2'dG allerdings in millimolarer Konzentration zum Medium zugesetzt, kommt es auch zu einem regulatorischen Effekt durch *xpt*, wie in den Reportergerentests gezeigt wurde.

Weiterhin wurde das synthetische *hybrid*-Aptamer im Reportergerentest untersucht. Das Aptamer besitzt die Bindetasche von *mfl*, die peripheren Elemente sind stabilisiert. Das *hybrid*-Aptamer zeigte keine regulatorische Aktivität im Reportergerentest, obwohl *in vitro* eine Bindung an 2'dG nachgewiesen werden konnte (161). In NMR-Studien wurde die Bindung von 2'dG an *hybrid* und *mfl* untersucht. Das *hybrid*-Aptamer bindet 2'dG nur in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , während die 2'dG-*mfl*-Bindung  $Mg^{2+}$  unabhängig ist. Obwohl *mfl* und *hybrid* die gleiche Sekundärstruktur besitzen, findet die Faltung zur bindungskompetenten Konformation nur bei *mfl* statt, und muss bei *hybrid* durch  $Mg^{2+}$  unterstützt werden. Es wird diskutiert, dass die Sequenz und die thermodynamische Stabilität des Aptamers für die Ligandenbindung entscheidend sind. Das Aptamer muss alleine flexibel sein, aber durch die Ligandenbindung ausreichend stabilisiert werden. Die An- und die Aus-Konformation des Schalters befinden sich in einem sensiblen Gleichgewicht. Werden wie beim *hybrid*-Aptamer Mutationen eingefügt, die die Stabilität beeinflussen, ist das Gleichgewicht gestört, was zum Funktionsverlust des Aptamers und des gesamten Schalters führt. *In vitro* konnte die Bindung durch  $Mg^{2+}$  wieder hergestellt werden. In NMR-Bindungsstudien, die in *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt wurden, war allerdings nur *mfl* bindungskompetent. Selbst ein vorgebildeter Komplex aus *hybrid* und 2'dG löste sich direkt nach Zugabe des Extrakts (162).

Das *hybrid*-Aptamer ist unter *in vivo* Bedingungen in Übereinstimmung mit den Reportergerentests bindungsinkompetent. Der Funktionsverlust des *hybrid*-Aptamers *in vivo* kommt durch einen Bestandteil des Oocytenextrakts zustande, eventuell durch einen ähnlichen Faktor in *B. subtilis*. Im Oocytenextrakt könnten Proteine für den Bindungsverlust verantwortlich sein wie Helikasen oder RNasen. Dagegen spricht, dass dann *mfl* ebenso von enzymatischer Entfaltung oder Abbau betroffen gewesen wäre. Die intakte 2D-Struktur der Aptamere konnte NMR-spektroskopisch über Stunden beobachtet werden. Erst nach 6-8 Stunden macht sich der enzymatischer Abbau der Aptamere bemerkbar. Ein möglicher Grund für den Funktionsverlust des *hybrid*-Aptamers in Oocytenextrakt und *B. subtilis* wäre, dass die *hybrid*-Faltung durch Osmolyte destabilisiert wird. Osmolyte sind kleine organische Moleküle wie Aminosäuren, Methylamine oder Zucker, die Zellen als Antwort auf osmotischen Stress produzieren oder aufnehmen. Es wurde gezeigt, dass Osmolyte  $Mg^{2+}$ -abhängige RNA-Strukturen wie den 2'dG-hybrid-Komplex destabilisieren können (163). Osmolyte beeinflussen

die Aktivität der  $Mg^{2+}$ -Ionen und dadurch auch die RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktion. Da *mfl*  $Mg^{2+}$ -unabhängig funktioniert, wird es nicht durch Osmolyte beeinflusst. Der Reportergentest wurde unter erhöhten Magnesiumkonzentrationen (5 mM, 50 mM) wiederholt, die 2'dG-*hybrid*-Interaktion konnte dadurch allerdings nicht wiederhergestellt werden. Einerseits ist die intrazelluläre Osmolyt-Konzentration hoch genug, um eine Steigerung der Ionenkonzentration auszugleichen. Andererseits wird die intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration in *B. subtilis* streng reguliert (durch einen  $Mg^{2+}$ -spezifischen RNA-Schalter (60)). Um die Osmolyt-Hypothese zu stärken, könnten NMR-Untersuchungen des 2'dG-*hybrid*-Komplexes mit verschiedenen Osmolyten durchgeführt werden.

Die Studien an 2'dG bindenden Aptameren konnte zeigen, dass die natürlich evolvierte Aptamer-Sequenz *mfl* in pro- und eukaryotischen Systemen bindungskompetent ist. Darüber hinaus reguliert die *mfl*-Aptamerdomäne als RNA-Schalter die Genexpression heterolog in *B. subtilis*. Damit wurde ein synthetischer RNA-Schalter aus natürlichen Komponenten entwickelt. Im Gegensatz dazu steht das künstliche *hybrid*-Aptamer, das nur *in vitro* bindungskompetent ist, nicht aber *in vivo*. Dieses Ergebnis zeigt, dass helikale Bereiche und Tertiärstrukturelemente der Purin-Aptamere zwar mutiert werden können, ohne die charakteristische Faltung oder Bindungskompetenz *in vitro* zu beeinflussen. Die biologische Funktion des Aptamers dagegen ist sensibel von Stabilität und Flexibilität abhängig, die ausschließlich durch die Sequenz definiert werden. Darüber hinaus konnte eine weitere wichtige Erkenntnis aus der Studie zur heterologen Expression von RNA-Schaltern gezogen werden: Die Regulationsstärke der RNA-Schalter ist reziprok von ihrer intrazellulären Konzentration abhängig. Dieses Phänomen konnte bei den verwendeten Purin-Schaltern und vergleichbaren externen Studien beobachtet werden.

## 5 Material

### 5.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2 - Deoxyguanosin	Sigma, München,
2- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2,6-Diaminopurin	Aldrich, München
2-Propanol	ProLabo VWR
Aceton	Roth, Karlsruhe
Adenin	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	PeqLab, Erlangen
Albumin Fraktion 5	AppliChem, USA
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Antifoam B Emulsion	Sigma, München
ATP	Roth, Karlsruhe
Benzamidin hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumcarbonat	Sigma, München
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
CyDye Labelling kit	GE, Schweden
Cytidine	Sigma, München
D - Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Di - Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dichlormethan	Sigma, München
Dimethylsulfoxid DMSO	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
DL-Norleucine, 98%	AlfaAesar (VWR)
Doxycycline	Sigma, München
DTT (Dithiothreitol)	Promega, USA
Dynabeads M280	Invitrogen, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisen-III-Chlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Eisen-II-Sulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe

## Material

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid, deionisiert	Roth, Karlsruhe
Glucose Monohydrat $\alpha$ D	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanin	Roth, Karlsruhe
HABA (4-Hydroxyazobenzene-2-Carboxylic Acid)	Sigma, München
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Heparin	Sigma, München
Hepes	Roth, Karlsruhe
I-Block	Applied Biosystems
Igepal CA-630	Sigma, München
Imidazol	Sigma, München
IPTG	peqLab, Erlangen
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid Plätzchen	Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kupfer-II-Chlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Lactosemonohydrat	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma, München
L-Glutathion reduziert	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Sigma, München
Lysozym	Roth, Karlsruhe
MacConkey-Bouillon	Roth, Karlsruhe
Magnesiumacetat Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat Pentahydrat	AppliChem USA



## Material

Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid	Roth, Karlsruhe
Nitrocefin	CalBiochem USA
ONPG	Roth, Karlsruhe
PhastGel Blue R	GE, Schweden
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma, München
Polyethylenglykol PEG 6000	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol PEG 1000	Roth, Karlsruhe
RNase T1	Roche, Basel
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose D+	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma, München
Thiamin Hydrochlorid	Sigma, München
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tricine	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Tween 100	Roth, Karlsruhe
Uracil	Sigma, München
Uridine	Sigma, München
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe

## 5.2 Puffer

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x C-Salze	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	250 mM
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	700 mM
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250 mM
5x M9-Salze	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	300 mM
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	11 mM
	$\text{NaCl}$	42 mM
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	93 mM
10x S-Base	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	150 mM
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 M

## Material

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	440 mM
	Trinatriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O	40 mM
Z-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	60 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	40 mM
	KCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	β-Mercaptoethanol	50 mM
10x TBE	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	Na-EDTA	10 mM
PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	pH 7,4	
TBS	Tris HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,5	
TAE	Tris	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,3	
6x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0.1%
	Xylencyanol	0.1%
	Glycerin	50%
	50x TAE	2%
2x RNA-Ladepuffer	Formamid	
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0.1%
	Xylencyanol	0.1%
PBST	PBS	1x
	Tween100	0,05%

## 5.3 Reaktionsansätze

Reaktion	Bestandteil	Konzentration
Selex I <i>in vitro</i> Transkription	dsDNA-Pool	-
	Magnesiumacetat	30 mM
	Tris-HCl pH 8,0	200 mM
	DTT	20 mM
	Spermidin	2 mM
	NTP	4 mM
	α- <sup>32</sup> P UTP	0,3 µM
	T7 RNA Polymerase	0,75 µg/ml
	H <sub>2</sub> O ad 100 µl	

## Material

Selex I Reverse Transkription	eluierte RNA (60 µl)	-
	dNTPs	1,3 mM
	first strand buffer	1x
	DTT	10 mM
	Oligo NC-rev	0,6 µM
	Superscript II Reverse Polymerase	2 U/µl
	H <sub>2</sub> O ad 100 µl	
Selex I PCR	ssDNA-Template	-
	NC-For-Primer	2,5 µM
	NC-Rev-Primer	2,5 µM
	dNTP	0,2 mM
	GC Phusion buffer	1x
	Phusion Polymerase	0,2 U/µl
	H <sub>2</sub> O ad 100 µl	
Selex II <i>in vitro</i> Transkription Mastermix	Tris HCl pH 8,0	200 mM
	DTT	5 mM
	NTPs	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	15 mM
	88 µl Aliquots bei -20°C gelagert	
Selex II RT-PCR Mastermix	PCR-Puffer ohne Mg <sup>2+</sup>	1x fach
	<i>First strand buffer</i> (Invitrogen)	0,2x fach
	DTT	2 mM
	NC-For	1 µM
	NC-Rev	1 µM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	dNTP	0,3 mM
	48 µl Aliquots bei -20°C gelagert	
Filterretention Mastermix	PBS	1x fach
	MgCl <sub>2</sub>	3,75 mM
	BSA	1,25 mg/ml
	Heparin	1,25 mg/ml
	α <sup>32</sup> P-UTP-RNA	Etwa 20 ips
	H <sub>2</sub> O ad 20 µl	
Phusion-PCR	Plasmid-Template	0,01 ng/µl
	HF-Puffer	1x
	Forwärts-Oligonukleotid	0,5 µM
	Rückwärts-Oligonukleotid	0,5 µM
	dNTP	0,2 mM
	Phusion Polymerase	0,02 U/µl
	H <sub>2</sub> O ad 100 µl	

## 5.4 Medien

Medium	Bestandteil	Konzentration
LB	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Trypton	10 g/l
2x YT	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Trypton	16 g/l
<i>Low Salt</i> Medium (LS)	S-Base	1x
	Glucose Monohydrat	0,50%
	L-Tryptophan	5 µg/ml
	Caseinhydrolysat	0,01%
	Hefeextrakt	0,10%
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2,5 µM
<i>High Salt</i> Medium (HS)	CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
	S-Base	1x
	Glucose Monohydrat	1%
	L-Tryptophan	0,05 mg/ml
	Caseinhydrolysat	0,02%
	Hefeextrakt	0,10%
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
*CSK-Medium	C-Salze	1x
	Natriumsuccinat	0,20%
	Kaliumglutamat	0,80%
	L-Tryptophan	50 µg/ml
	CAF	22 µg/ml
	Glukose	0,50%
	Chloramphenicol	1x
	MgSO <sub>4</sub>	0,5 mM
	MnSO <sub>4</sub>	10 µM
Minimalmedium M9	M9 Salze	1x
	MgSO <sub>4</sub>	2 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
	Glukose	0,4% w/w
	Thiamin	0,1 mM
Medienzusätze	Ampicillin	100 µg/ml
	Kanamycin	50 µg/ml
	Tetrazyklin	15 µg/ml
	Chloramphenicol	5 µg/ml

## 5.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz
1012_F	GTGGCGGAGCGCAGCAGAGG
909_3'-10	CCACGAAACTCACTTTAAACTCGCC
909_3'-10	CCACGAAACTCACTTTAAACTCGCC
909_3'-20	ACTTTAAACTCGCCACAGAACCTC
909_3'-30	CGCCACAGAACCTCACTCATCCTAC
909_3'-40	CCTCACTCATCCTACAACACTCAAC
909_3'-50	CCTACAACACTCAACCGGTTG
909_3'-60	TCAACCGGTTGATATCTATCTCC
909_3'-70	GATATCTATCTCCCTCCTCTCC
909_5'-10	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGATAGATATCAACCGGTTGAGT
909_5'-20	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGCCGGTTGAGTGTTGTAGGAT
909_5'-30	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGGTTGTAGGATGAGTGAGGTT
909_5'-40	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGGAGTGAGGTTCTGTGGCGAG
909_5'-50	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGCTGTGGCGAGTTTAAAGTGA
909_5'-60	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGTTTAAAGTGAGTTTCGTGGA
909_5'-70	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Ars_1'	AATTCGGCTTCATATAATCCTAATGATATGGTTT
Ars_3'	CGCTTTATCCGAAATTTTATAAAGAGAAGACTCATGAATGGTAC
Ars_4'	AAACTCCCAAACCATATCATTAGGATTATATGAAGCCG
Ars_6'	CATTCATGAGTCTTCTCTTTATAAAATTTT
Ask_seq_f	GAGTTATTTTTACCACTCCCT
Ask_seq_r	CGCAGTAGCGGTAAACG
ATGfor	AAATCTAACAATGCGCTCATCGTC
ATGrev	GGGTACCTTTCTCCTCTTTAATGAATT
bla seq f	GAGTTATGCAGTGCTGCC
bla seq r	TTGCTGCAGGCATCGTGGTG
bla XP corr r	CTCCAAGCGCTGAGACCCCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
bla XP f	AATTCGGCCGGAGACCGCAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG
bla XP r	CTCCAAGCGCTGAGACCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
bla_nhel_f	GTTTACGCTAGCATTCAACATTTCCGTGCGCC
fWH948_50UTR	CGAAAAACAGGTGCTAGACTTTTCGGCGATCAACGCTTCATATAATCCTA
fWH948_ARS_20UTR	TAAATGCTTAAGGCTAGACTTTTCGGCGATCAACGCTTCATATAATCCTA
gfp_R	CTAATTCAACAAGAATTGGG
His_f	AGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCC
His_r	CATTTGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGATTTTTGTGCG
HP1M_Fo	ATATGGCACGCCTGACCCCGCCGCGGACCGTAAATCTGCGACTATAAGTGAAAAACCACTC
HP1M_Ro	CGGGGTGAGGCGTGCCATATCCACGCCCCTGTATGCTTTCTTTTATATTGAG
LaZ_rev	CGATTAAGTTGGGTAACGCC
M_C74A_F	CGCCTTCAAACCTATTTGGAGAATATAAGTGAAAAACCACTC
M_C74A_R	GAGTGGTTTTTCACTTATATTCTCAAATAGGTTTGAAGGCG
Meso_lacZ_F	GAGAAAAAGAAAGGATATTATATGAAAGGGAATTCACTGGC
Meso_lacZ_R	GCCAGTGAATTCCCTTTCATATAATATCCTTTCTTTTCTC
Min 9.14 F	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGTATCAACGTAACAGTAC
MP1H_Fo	TAATGGGCTACTGACCCCGCCTTCAAACCTATTTGGAGACTATGCTGAAAAACCACTC

MP1H_Ro	GAAGGCGGGGTCAGTAGCCATTATGCTACCCTGTATGCTTTCTTTATATTCAG
NC-For	CCAAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAA
NC-Pool	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAA-N50-GAGTTTCGTGGATGCCACAGGAC
NC-Rev	GTCCTGTGGCATCCACGAACTC
Nhe_R	TGAGCTCCATCATGCTAGCC
nhel corr f	GTTTACGCTACGATTCAACATTTCCGTGTCGC
Pbla_Meso_F	GTCATGAGACAATAACCCTGGTACCGAAATGCTTAAG
Pbla_Meso_R	CTTAAGCATTTCCGTACCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
Pbla_PbuE_fwd	GTCATGAGACAATAACCCTAGCTATTATCACTTGTATAACC
Pbla_Pbue_rev	GGTTATACAAGTGATAATAGCTAGGGTTATTGTCTCATGAGC
pBlaHM_F	GAGACAATAACCCTGATAAATGCCGCATGAGGTACCGAAATGC
pBlaHM_R	GCATTTCCGGTACCTCATGCGGCATTTATCAGGGTTATTGTCTC
PbuE_lacZ_fwd	CAAAACATTTAAGTAAAGGAGTTTGTATGAAAGGGAATTCAGTGGC
PbuE_lacZ_rev	GCCAGTGAATTCCCTTTCATAACAACTCCTTTACTTAAATGTTTTG
pLacF1	AACAATTGAATTCGGCTTCATATAATCCTAATG
pLacF2	CGAAATTTTATAAAGAGAAGACTCATGAAATCTAACAATGCGCTCATCG
pLacR1	CGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATGAGTCTTCTCTTTATAAAATTCG
pLacR2	CGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTG
rWH948_50UTR	CTGATAAATGCTTAAGTTTGTACATTGCTGAGGCGAAAAACAGGTGCT
rWH948_ARS_0CDS	TGAATTGCTAGCATTTCATGAGTCTTCTCTTT
rWH948_ARS_12CDS	TGAATTGCTAGCCAGGTCAAAGTAATTCATGAGTCTTCTCTTT
rWH948_ARS_18CDS	TGAATTGCTAGCCTTCGGCAGGTCAAAGTAATTCATGAGTCTTCTCTTT
rWH948_ARS_3CDS	TGAATTGCTAGCGTAATTCATGAGTCTTCTCTTT
rWH948_ARS_6CDS	TGAATTGCTAGCAAAGTAATTCATGAGTCTTCTCTTT
rWH948_ARS_9CDS	TGAATTGCTAGCGTCAAAGTAATTCATGAGTCTTCTCTTTATAAA
Seq_948_for	CGCTCATGAGACAATAACCC
Sma_F	TAAAAGTGCGCGTGCGAGCCC
T7_Promotor_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
Tem-1F1	CACTGCTGCCAACTTACTTCTG
TEM-1R1	TCAAGGCGAGTTACATGATCC

## 5.6 Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
pASK-IBA3plus	Amp <sup>R</sup> P <sub>tet</sub> Proteinexpression +Streptag C-terminal	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA3plus_TEM1	Amp <sup>R</sup> P <sub>tet</sub> TEM1-Expression +Streptag C-terminal	diese Arbeit
pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup> P <sub>tet</sub> Proteinexpression +Streptag C-terminal +Histag N-terminal	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA43plus_TEM1	Amp <sup>R</sup> P <sub>tet</sub> TEM1-Expression +Streptag C-terminal +Histag N-terminal	diese Arbeit
pDG-xpt-H	Derivat von pDG-xpt-wt mit verändertem Riboswitch	diese Arbeit
pDG-xpt-M	Derivat von pDG-xpt-wt mit verändertem Riboswitch	diese Arbeit
pDG-xpt-M-C74A	Derivat von pDG-xpt-wt mit verändertem Riboswitch	diese Arbeit

# Material

pDG-xpt-wt	Amp <sup>R</sup> <i>amyE'</i> <i>spoVG-lacZ cat 'amyE</i> , Insertion von <i>lacZ</i> und Cm <sup>R</sup> in den <i>amyE</i> Lokus von <i>B. subtilis</i> 168, xpt-Riboswitch im 5'UTR von <i>lacZ</i> , $\beta$ -Galactosidase-Messung in <i>B. subtilis</i>	M. Rudolph, Darmstadt (53)
pET16b_NDM1	Amp <sup>R</sup> O <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> NDM1-Expression +Histag N-terminal	T. Wichelhaus, Frankfurt (164)
pET28a_MecR1_pbd	Kan <sup>R</sup> P <sub>ara</sub> MecR1-Expression +Histag C-terminal	F(165)X. Gomis-Rüth, Barcelona (114)
pGEX6P1_tet_PBP2x_soluble	Tet <sup>R</sup> O <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> PBP2x-Expression (löslicher Teil: Aminosäuren 1-18 + 49-750) als GST-Fusion	R. Hakenbeck, Saarbrücken (166)
pSpeedET_Harvard	Kan <sup>R</sup> O <sub>lac</sub> P <sub>T7</sub> Expression putative $\beta$ -Lactamase	Harvard Plasmidbank
pWH948	Amp <sup>R</sup> P <sub>Bla</sub> <i>lacZ</i> , $\beta$ -Galactosidase-Messung in <i>E. coli</i>	W. Hillen, Erlangen
pWH948_add_20ARS	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS03	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS06	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS09	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS12	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS15	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_20ARS18	Derivat von pWH948_add_ARS mit modifizierter Riboswitchumgebung	diese Arbeit
pWH948_add_ARS	Amp <sup>R</sup> P <sub>Bla</sub> <i>lacZ</i> +add Riboswitch im 5'UTR, $\beta$ -Galactosidase-Messung in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pWH948-NheI-AfIII	Derivat von pWH948 mit Restriktionsschnittstellen NheI und AfIII im 5'UTR von <i>lacZ</i>	J. Weigand, Darmstadt
pWH948-NheI-AfIII_H	Derivat von pWH948-NheI-AfIII mit Hybrid-Riboswitch	diese Arbeit
pWH948-NheI-AfIII_HP1M	Derivat von pWH948-NheI-AfIII mit modifiziertem Riboswitch	diese Arbeit
pWH948-NheI-AfIII_M	Derivat von pWH948-NheI-AfIII mit 2'dG-Riboswitch	diese Arbeit
pWH948-NheI-AfIII_M-C74A	Derivat von pWH948-NheI-AfIII mit modifiziertem Riboswitch	diese Arbeit
pWH948-NheI-AfIII_MP1H	Derivat von pWH948-NheI-AfIII mit modifiziertem Riboswitch	diese Arbeit
pWH948-pbuE-5'UTR	Derivat von pWH948 mit <i>pbuE</i> -5'UTR vor <i>lacZ</i>	F. Groher, Darmstadt

## 5.7 Stämme

Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (*hsdR17*( $r_K - m_K^+$ ), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *relA1*, *supE44*,  $\phi 80$  *lacZ*  $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169) wurde für Klonierungen verwendet. Stamm WH207 ( $\Delta$ *lacX74*, *galK2*, *rpsL*, *recA13*) diente als Stamm für  $\beta$ -Galactosidase-Messungen (165). Beide Stämme sind von *Escherichia coli* K12 abgeleitet. Für  $\beta$ -Galactosidase-Messungen in *B. subtilis* wurde der Stamm 168 (*trpC2*) verwendet. Durch Insertion des LacZ-Gens mit 5'-ständigen RNA-Schaltern (RS) am *amyE*-Locus wurden die Stämme 168\_xpt, 168\_H, 168\_M und 168\_C74A erstellt (Genotyp: *trpC2 amyE:: P<sub>spac</sub> RS spoVG-lacZ cat*).

## 5.8 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTApure Chromatographie-Automat	GE, Schweden
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Dot Blot Apparatur	Biorad, München
Geldokumentation mit UV Schirm (254 nm und 312 nm)	INTAS, Göttingen
Gelschüttler GFL	Karow, Berlin
Infinite M200 Fluoreszenz Plattenleser	Tecan Trading AG, Schweiz
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
MicroPulser Elektroporator	Biorad, München
Milli-Q Wasserentsalzung mit RNase Filter	Millipore, Frankreich
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen
NU-6 KL UV-Handlampe	Benda, Wiesloch
PAGE-Systeme	C.B.S. Scientific, Del Mar
Phosphoimager Typhoon 9400	GE, Schweden
Thermocycler Peqstar Universal 96	peqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Liquid Scintillation Counter 1409	Wallac, Monza

## 5.9 Enzyme

Enzyme	Hersteller
<b>Polymerasen</b>	
Phusion DNA-Polymerase [2 U/ $\mu$ l]	New England Biolabs, USA
SuperScript II Reverse Transkriptase [200 U/ $\mu$ l]	Invitrogen, USA
T7 RNA-Polymerase	diese Arbeit
Taq DNA-Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	diese Arbeit
<b>Restriktions Endonukleasen</b>	
AflIII [20 U/ $\mu$ l]	New England Biolabs, USA
AgeI-HF [20 U/ $\mu$ l]	New England Biolabs, USA



## Material

BglII [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
EcoRI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
HindIII-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NcoI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NheI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NotI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
XbaI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA

### Diverse

Antarctic Phosphatase [5 U/μl]	New England Biolabs, USA
SUPERase-In [20 U/μl]	Ambion, USA
Rnasin [20 U/μl]	Promega, USA
T4 DNA Ligase [400 U/μl]	New England Biolabs, USA
T4 Polynucleotide Kinase [10 U/μl]	Roche, Basel
Dnase I [10 U/μl]	Roche, Basel
Prescission Protease [10 U/μl]	Shanghai Genomics, China
TEV-Protease	diese Arbeit
Faktor-X Protease [10 U/μl]	Qiagen, Hilden

### Marker

pegGold 1 kB DNA-Leiter	PeqLab, Erlangen
peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II	PeqLab, Erlangen
low range ssRNA ladder	New England Biolabs, USA
prestained protein ladder (10-230 kDa)	New England Biolabs, USA

## 6 Methoden

### 6.1 Selex I

#### 6.1.1 Initialer DNA-Pool

Die initiale Pool-PCR wurde in 2 ml Reaktionsansatz durchgeführt. Insgesamt wurde 1 nmol Template-Oligonukleotid in die PCR eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktion ist im Materialteil Reaktionsansätze angegeben. Der Ansatz wurde auf 100 µl Aliquots in 200 µl Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Reaktion wurde in einem Pqstar Universal 96 Thermocycler durchgeführt, in Tabelle 8 sind die Temperaturbedingungen der PCR angegeben. Der initiale dsDNA-Pool wurde über das PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt. Der gesamte dsDNA-Pool wurde in die initiale *in vitro* Transkription eingesetzt.

Tabelle 8: Temperaturregime der initialen PCR

Temperatur in °C	Zeit in Minuten (+ Sekunden)	Zyklenzahl
98	1	6
98	1	
58	1	
72	1 +10	

#### 6.1.2 *In vitro* Transkription

Die initiale *in vitro* Transkription wurde in 2 ml Reaktionsvolumen durchgeführt, es wurde keine Radioaktivität zugesetzt. Ein radioaktiver Standardansatz von 100 µl wurde parallel mitgeführt und später dazu gemischt. Die initiale *in vitro* Transkription wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die *In vitro* Transkriptionen während der Selektion wurden für vier bis fünf Stunden im 100 µl Ansatz durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist im Materialteil Reaktionsansätze angegeben. Das Produkt wurde über denaturierende PAGE, 6%, 8M Harnstoff aufgereinigt. Die Produktbande wurde ausgeschnitten, die RNA eluiert, gefällt, und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Pool wurde zur Neufaltung für 3' auf 96°C erhitzt, dann bei Raumtemperatur abgekühlt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### 6.1.3 Zielprotein an CNBr-aktivierte Sepharose koppeln

Das gereinigte Protein wurde gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,4; 0,5 M NaCl) über Nacht bei 4°C dialysiert. Für die Kopplung durften keine nukleophilen Puffersubstanzen verwendet werden, da diese mit der CNBr-aktivierten Sepharose reagierten. 1 g aktivierte Sepharose wurde zunächst in

30 ml 1 mM kalter HCl gelöst und eine halbe Stunde aufgeschwemmt, dann durch einen Glastrichter gefiltert. Das Säulenmaterial wurde mit 5 - 10 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Säulenmaterial wurde dann mit Kopplungspuffer gewaschen und direkt darauf mit 5-10 mg Protein pro ml Säulenmaterial zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Danach wurde nochmal mit Kopplungspuffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden freie CNBr-Gruppen abgesättigt durch Inkubation mit Blockpuffer (0,2 M Glycin, pH 8,0) bei 25°C für zwei Stunden. Das Säulenmaterial wurde dann fünfmal abwechselnd mit Kopplungspuffer und Waschpuffer (0,1 M Acetat, pH 4,0; 0,5 M NaCl) gewaschen. Schließlich wurde das Säulenmaterial in Lagerungspuffer (1 M NaCl) äquilibriert und bei 2 - 8°C aufbewahrt

### **6.1.4 Selektion mittels Affinitätschromatographie**

Jeweils 1 ml Säulenmaterial ohne TEM1 wurde in BioRad Einmalsäulen gefüllt und mit Bindungspuffer (100 mM KaliumPhosphat, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) äquilibriert. Dann wurde der RNA-Pool auf die Säule gegeben und mit mehreren Säulenvolumen schrittweise gewaschen. Die Waschfraktionen wurden einzeln aufgefangen. Die Elution erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 300 mM NaAcetat, 3 mM EDTA). 10 µl jeder Fraktion wurden mit 4 ml Scintillationscocktail (Roth, Karlsruhe) versetzt und im Scintillationszähler ausgemessen. Die erste Waschfraktion der Vorsäule W1 wurde auf die Hauptsäule mit Zielprotein gegeben. Diese wurde exakt wie die Vorsäule behandelt. Die Anzahl der Waschschrte bestimmte die Stringenz der Selektion. Schließlich wurde die radioaktivste Elutionsfraktion für die Regeneration des RNA-Pools verwendet. Die Fraktion wurde gefällt, in 60 µl Wasser aufgenommen und in die reverse Transkription eingesetzt.

### **6.1.5 Reverse Transkription und PCR**

Die reverse Transkription wurde für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktion ist im Materialteil Reaktionsansätze angegeben. Im Anschluss wurde die radioaktive RNA eine Stunde bei 37°C durch RnaseH verdaut. Danach wurde die cDNA durch das PCR Purifikation Kit (Qiagen) aufgereinigt. RnaseH-Verdau und PCR-Aufreinigung wurden solange wiederholt, bis die Radioaktivität der Probe auf Hintergrundniveau abgefallen war.

Ein Drittel der cDNA wurde in eine erste Test-PCR eingesetzt. Die Zusammensetzung und das Temperaturregime waren bei der Test- und der späteren PCR gleich. Es wurde das gleiche Temperaturregime wie in Tabelle 8 verwendet. Durch die Test-PCR wurde festgestellt, wie viele PCR-Zyklen für die Amplifikation des DNA-Pools benötigt wurden. Nach jedem zweiten PCR-Zyklus wurden 5 µl aus der Reaktion entnommen und in DNA-Ladepuffer gelagert. Nach Abschluss der PCR wurden die gesammelten Proben durch native PAGE analysiert. Es war wichtig, die Proben immer am Ende der Elongationsphase des PCR-Zyklus zu entnehmen. Wurden Proben beispielsweise während der

Denaturierungsphase entnommen, zeigten sie ein völlig anderes Laufverhalten. Anhand der Stärke der Produktbande wurde die passende Zyklenzahl festgelegt und die PCR unter gleichen Bedingungen wiederholt. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt wiederum über PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Der entstandene dsDNA-Pool sowie die verbliebende cDNA wurde bei -20°C gelagert.

## 6.2 Selex II

### 6.2.1 Initialer DNA-Pool

Die neue initiale PCR wurde nach Protokoll von Ellington *et al.* durchgeführt (4). Sie wurde im 60-fachen Volumen der alten initialen PCR durchgeführt. Dadurch konnte das N50-Templat in höherer Verdünnung eingesetzt werden, was zu einer besseren Umsetzung des Template-Oligonukleotids zu dsDNA führte. Um die Kosten der PCR bei so hohem Volumen gering zu halten, wurde selbstpräparierte Taq-Polymerase statt Phusion (NEB) verwendet. Die höhere Fehlerrate der Taq gegenüber der Phusion ist in der Selektion unproblematisch. Im Gegenteil kann die höhere Mutationsrate zu einem variableren Pool führen.

Tabelle 9: Temperaturregime der Initial-PCR II

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Zyklenzahl
98	2	8
58	1	
72	3	

Das Reaktionsvolumen von 130 µl wurde auf 96-well Platten aufgeteilt, die Reaktion wurde in PqStar Universal 96 Thermocyclern durchgeführt. Pro well wurden 150 µl Ansatz eingesetzt, dabei wurde darauf geachtet, dass die Füllhöhe nicht das Niveau des Thermoblocks überstieg. Etwa ein Viertel des Reaktionsvolumens verdunstete während der Reaktion, sodass am Ende 100 µl PCR-Produkt erhalten wurden. Diese wurden gefällt und durch Gelfiltration aufgereinigt. Es wurde eine Sephacryl S-100 16/60 Säule verwendet, als Laufpuffer diente 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und mittels nativer PAGE analysiert. Die Produkt-Fraktionen wurden vereinigt und die Ausbeute durch Absorptionsmessung bei 260 nm mittels Nanodrop bestimmt.

### 6.2.2 *In vitro* Transkription

Der Transkriptionsmastermix wurde in Portionen von 88 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Transkription wurde durch Zugabe von 10 µl dsDNA-Pool und jeweils 1 µl T7 RNA-Polymerase und Rnasin gestartet. Die Konzentration von T7 RNA-Polymerase und Rnasin im Reaktionsansatz betrug

30 µg/ml respektive 0,2 U/µl. Die initiale Transkription wurde in 100-fachem Maßstab (10 ml) bei 37°C über Nacht durchgeführt, dann über präparative PAGE aufgearbeitet. Die Standardtranskription wurde für 15' bei 37°C durchgeführt und direkt in die Selektion eingesetzt.

### 6.2.3 Zielproteine an magnetische Beads koppeln

Gereinigte Zielproteine wurden biotinyliert, dann an Streptavidin beschichtete magnetische Beads gekoppelt. Die Biotinylierung erfolgte durch Inkubation von 100 µl einer 1 mg/ml Zielproteinlösung in PBS mit einem doppelten molaren Überschuss von Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo) bei 25°C für eine Stunde. Anschließend wurde freies Sulfo-NHS-LC-Biotin durch Gelfiltration mit *MicroBioSpin Columns* (BioRad) aus der Proteinlösung entfernt. Dabei wurde das Herstellerprotokoll verwendet, die Säulen wurden jedoch viermal mit PBS äquilibriert statt zweimal wie empfohlen.

Die Proteinlösung wurde durch Dot Blot auf Biotinylierung untersucht. Es wurden 0,5 µl bis 3 µl große Tropfen auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben und 40 min bei 25°C getrocknet. Anschließend wurde die Membran mit einer BSA-Lösung (1 mg/ml, PBS) für eine Stunde bei 25°C geblockt. Danach wurde die Membran mit einer 1:10000 verdünnten Streptavidin-HRP-Konjugat Lösung (in PBST) inkubiert. Es wurde dreimal mit PBST gewaschen, dann die HRP-Aktivität auf der Membran durch das *advanced ecl detection kit* (GE) nachgewiesen.

Die Immobilisierung des Zielproteins wurde standardmäßig mit 500 µl M280 Dynabeads Suspension durchgeführt. Die Beads wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß an einem magnetischen Ständer dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Dann wurden 100 µg biotinyliertes Zielprotein mit den Beads in 500 µl PBS eine halbe Stunde bei 25°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 500 µl 1,25x PBS, 1 mg/ml BSA gewaschen. Die Waschfraktionen sowie eine Probe des biotinylierten Proteins wurden aufbewahrt und zur Kontrolle der Immobilisierung durch SDS-PAGE analysiert. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und nicht länger als eine Woche verwendet.

### 6.2.4 Selektion mittels magnetischer Beads

In die erste Selektionsrunde wurde 1 nmol naiver RNA-Pool eingesetzt und mit 80 µl Protein-gekoppelter Beadsuspension bei 37°C für eine halbe Stunde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert. In den darauffolgenden Runden wurden 20 µl der Transkriptionsreaktion mit 80 µl Protein-Beadsuspension inkubiert. Als Selektionspuffer wurde PBS mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Nach der Inkubation wurden die Beads vorsichtig an einem magnetischen Reaktionsgefäßständer gewaschen. Dafür wurden die Beads eine Minute am Magnetständer sedimentiert, dann wurde der Überstand abgenommen. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Magnetständer entnommen und die Beads wurden sanft mit 100 µl Selektionspuffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde im Laufe der Selektion immer häufiger wiederholt um die Stringenz zu erhöhen. Der Stringenzverlauf ist in Tabelle

10 angegeben. Anschließend wurden die Beads in 55 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 5' bei 80°C zur Elution inkubiert. Bei 80°C löst sich die Biotin-Streptavidin-Bindung, und Protein-RNA-Komplexe gehen in Lösung. Die Suspension wird nach der Elution ein letztes Mal am Magnetständer sedimentiert und 50 µl des Überstandes werden direkt in die RT-PCR eingesetzt.

**Tabelle 10: Stringenzverlauf der Selektion**

Selektionsrunde	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Waschschritte	2	2	4	6	8	10	10	10	10

### 6.2.5 RT-PCR

Ein Aliquot RT-PCR Mastermix mit 50 µl der Elution wurden zunächst 5' bei 65°C inkubiert, dann auf 4°C abgekühlt. Danach wurden jeweils 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase von Invitrogen (2,5 U/µl) und Taq-Polymerase (0,05 U/µl) zugegeben. Die Reaktion begann mit einer zehnminütigen reversen Transkription bei 54°C, darauf folgte die PCR. Das Temperaturregime während der Reaktion ist in Tabelle 11 dargestellt. Nach sechs PCR-Zyklen wurde die Reaktion durch Kühlen auf 4°C abgestoppt und der Fortschritt der Reaktion im Agarosegel geprüft. Wenn die Produktbande noch nicht sichtbar war, wurden weitere vier Zyklen durchgeführt. War eine schwache Produktbande erkennbar, wurden zwei weitere Zyklen durchgeführt. Bei starker Überamplifikation wurden in der folgenden Selektionsrunde weniger Zyklen angesetzt. Falls die Überamplifikation weiterhin auftrat, wurden beide Selektionsrunden wiederholt. Die Zahl der PCR-Zyklen wurde dann von Anfang an heruntergesetzt.

**Tabelle 11: RT-PCR Temperaturregime**

Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Zyklenzahl
54	10	1
98	1	
58	1	≥6
72	1,5	

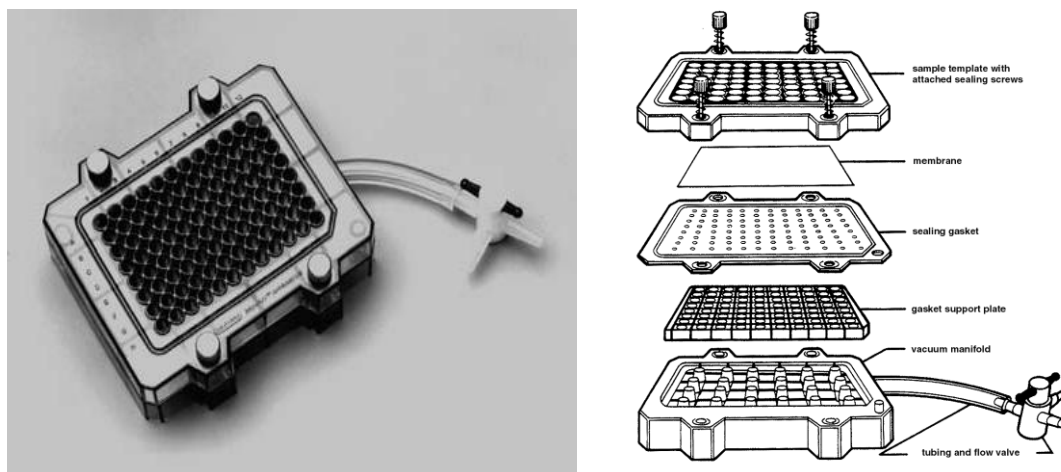
## 6.3 Auswertung der Selektionen

Nach neun Runden Selektion wurden RNA-Pools ausgewählter Runden radioaktiv markiert und durch Filterretention auf Proteinbindung untersucht. Die radioaktive Markierung erfolgte durch sogenanntes *body labeling*, der *in vitro* Transkription aus dem Selektionsprotokoll II (siehe Reaktionsansätze) wurden dabei 0,5 µl - 1 µl radioaktives α-<sup>32</sup>P-UTP zugesetzt. Die radioaktiven Pools

wurden durch PCR-Aufreinigung von freiem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP befreit und durch denaturierende PAGE auf Reinheit analysiert.

### 6.3.1 Filterretention

Der erste Schritt der Filterretention war die Inkubation von RNA-Pool in konstanter Konzentration mit steigender Konzentration Zielprotein. Dafür wurden ein RNA-haltiger Mastermix (siehe Reaktionsansätze) und eine Proteinkonzentrationsreihe erstellt. Das Zielprotein wurde in PBS auf 5  $\mu$ M verdünnt, davon ausgehend wurden weitere Verdünnungen in Zehnerpotenz bis 5 nM erstellt. In 96-well Platten mit rundem Boden wurden dann jeweils 20  $\mu$ l RNA-Mastermix mit 5  $\mu$ l Proteinverdünnung bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Nitrozellulose-Membran vorbereitet. Die Membran wurde zunächst in Kathodenpuffer ohne Methanol (27 mM Tris HCl, 40 mM Norleucin, pH 9,4) geblockt, dann in Selektionspuffer äquilibriert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran in eine vakuumbetriebene *dot blot*-Apparatur (BioRad) gespannt. Diese ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: dot blot Apparatur (Biorad) im 96-well Format. Links Aufsicht, Rechts Explosionszeichnung: von oben nach unten: Deckel mit Schrauben zur Befestigung, Filtermembran (Nitrozellulose), Dichtungs-Gummimatte, Gitter zur Unterstützung der Dichtung, Auffanggefäß mit Ablauf und Dreiwegehahn. Quelle: (167)**

Das RNA-Protein-Gemisch wurde spaltenweise über die Apparatur mit Hilfe einer 8-Kanalpipette filtriert. Unter ständigem Vakuum wurde zunächst eine Spalte mit 200  $\mu$ l Selektionspuffer gespült. Dann wurden 20  $\mu$ l des RNA-Protein-Gemischs aufgetragen, anschließend wurde dreimal mit 200  $\mu$ l Selektionspuffer gespült. Jedes Volumen auf dem Filter wurde komplett abgesaugt, bevor das Nächste aufgetragen wurde. Nach Abschluss der Filtration wurde die Membran entnommen und durch Phosphoimaging ausgewertet.

### 6.3.2 Analyse der Einzelsequenzen

Angereicherte DNA-Pools wurden über das *CloneJet PCR cloning kit* (Fermentas) in den pJet1.2/blunt Vektor nach Herstellerprotokoll kloniert (168) und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Mindestens 20 Klone

wurden vereinzelt und durch Kolonie-PCR auf Einbau der Poolsequenz überprüft. Der N50-Bereich wurde mittels des pJet1.2\_reverse\_sequencing\_primer sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden sortiert und auf Sequenzmotive untersucht. *In silico* wurden Sekundärstrukturen durch RNAfold (140) und RNASHAPes (141) verglichen. Die Einzelsequenzen wurden mittels Phusion-PCR (Reaktionsansätze, Herstellerprotokoll) vervielfältigt. Dann wurden sie nach Selektionsprotokoll *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. Wie oben beschrieben wurden die Einzelsequenzen durch Filterretention auf Proteinbindung getestet.

## 6.4 Proteinexpression

### 6.4.1 Überexpression

Die Überexpressionsvektoren wurden in *E. coli*-Stamm BL21 transformiert, der eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens enthält. Von den Transformanten wurden Vorkulturen angeimpft, die über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt wurden. Danach wurde ein definiertes Volumen der Vorkultur in die Expressionskultur überimpft, die ebenfalls bei 37 °C geschüttelt wurde. Durch regelmäßige Probenentnahme und Messung der optischen Dichte bei 600 nm (oD600) wurde das Wachstum der Zellen kontrolliert. Bei Erreichen einer oD600 von etwa 0,5 wurde die Überexpression des jeweiligen Proteins durch Zugabe eines Induktors zur Expressionskultur induziert. Nach definierter Expressionsdauer wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500x g für 12' bei 4 °C geerntet.

Tabelle 12: Expressionscharakteristika der PBP

Protein	TEM1	put. Bla	MecR1	NDM1	PBP2x
Plasmid	pASK-IBA-3+	pSpeedET	pET-28a	pET-16b	pGEX-tet-PBP2x
Resistenz	kan	kan	kan	amp	tet
Medium	LB	LB	2x YT	LB	2x YT
Induktor	Doxzyclin	IPTG	Arabinose	IPTG	IPTG
Induktorkonzentration in mM	0,05	1	8	1	1
Expressionsdauer in h	3	3	3	15	15
Expressionstemperatur in °C	37	37	37	16	25
Affinitätsmarker	StrepII	His6	His6	His6	GST
Affinitäts-chromatographie	Strep-Tactin	Ni-NTA	Ni-NTA	Ni-NTA	Glutathion

Die geernteten Zellen wurden mittels einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Die Beschallung wurde in 15 ml oder 50 ml Schraubdeckelgefäßen in Eiswasser durchgeführt in einem Rhythmus von 1'



Schall und 1' Abkühlung. Die Zellen wurden um die 5' beschallt, dabei die Viskosität und die Opazität des Lysats optisch und die Temperatur manuell kontrolliert. Die Soundmaschine wurde auf 50% Arbeitszyklus bei 250 W Leistung gestellt. Das Zelllysate wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 4°C und 17000x g für 20' von unlöslichen Bestandteilen geklärt und mit 2 mM PMSF, 0,1 mM Benzamidin und einigen Kristallen DNaseI versetzt.

### 6.4.2 Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographien wurden mit aufbereitetem Zelllysate im Kühlschrank bei 4°C durch Schwerkraftfluss durchgeführt. Das Säulenvolumen betrug etwa 1 ml, Fraktionen wurden in 1 bis 2 ml Größe gesammelt. Als Waschpuffer wurde TBS verwendet, zur Elution wurde TBS mit geeigneter Eluenten-Konzentration verwendet. Die Zahl der Waschschriffe wurde oD280-Absorptionsmessung der Waschfraktionen festgelegt. Sobald die Absorption der Fraktionen gegen Null ging, wurde mit der Elution begonnen. Die Ni-NTA Säulen wurden mit steigenden Konzentrationen von Imidazol eluiert, wobei bereits im Waschpuffer 20 mM Imidazol vorlagen. Die Imidazol-Konzentration wurde in der Elution stufenweise über 100 und 200 bis auf 500 mM gesteigert. Die Strep-Tactin Säule wurde lediglich mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert. Bei PBP2x wurde ein anderes Verfahren zur Elution angewendet. Der GST-Affinitätsmarker von PBP2x wurde auf der Säule durch Prescission Protease Verdau (20 U in 1 ml TBS) über Nacht bei 4°C abgeschnitten. Am nächsten Tag konnte freies PBP2x von der Säule gewaschen werden. Da die Protease selbst einen GST-Marker besitzt, verblieb sie auf der Säule. Die nachfolgende Elution der Säule mit 10 mM Glutathion in TBS wurde nur noch zur Aufbereitung des Säulenmaterials vor der nächsten Benutzung durchgeführt.

Zur Vorbereitung auf die Selektion wurden sämtliche Proteine durch Dialyse in PBS umgepuffert. Die Dialyse wurde in Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (Fisher) mit 10 kDa Porengröße bei 4°C mit vorgekühltem PBS durchgeführt. Im Regelfall wurde zweimal gegen 1 l PBS dialysiert. Die Reinheit der Proteine wurde durch SDS-PAGE überprüft.

## 6.5 $\beta$ -Lactamase Aktivitätstest

Die Aktivitäten der  $\beta$ -Lactamasen TEM1, NDM1 und putBla wurden mittels des chromogenen Substrats Nitrocefin gemessen. Nitrocefin ist ein  $\beta$ -Lactam gelber Färbung, die durch Spaltung des Lactam-Rings beispielsweise durch eine  $\beta$ -Lactamase nach rot umschlägt. Die Produktkonzentration in der Enzymreaktion kann photometrisch über die Absorption bei 486 nm bei pH 7,0 bestimmt werden, der Extinktionskoeffizient beträgt  $20500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die Nitrocefin-Stocklösung wurde nach Herstellerangaben vorbereitet (Calbiochem über VWR). Für Michaelis-Menten-Kinetiken wurden Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktion in Abhängigkeit der Nitrocefinkonzentration aufgenommen. Es wurden Nitrocefinkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die

Messungen wurden in Selektionspuffer bei 25°C durchgeführt. 900 µl Proteinlösung lagen in einer Halbmikroküvette vor, die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Nitrocefinlösung gestartet. Der Verlauf der Reaktion wurde mit einem UV/Vis-Photometer bei 486 nm aufgezeichnet. Die Enzymkonzentration wurde in diesen Versuchen konstant gehalten und so eingestellt, dass die Reaktion im Rahmen der Methode messbar war. Die Enzyme wurden verdünnt in einer Konzentration von 30 nM eingesetzt, da die Reaktion sonst zu schnell ablief und die lineare Produktzunahme nicht mehr beobachtet werden konnte. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde aus der Steigung der linearen Produktzunahme zu Beginn der Reaktion berechnet. Das Michaelis-Menten-Diagramm wurde durch nichtlineare Regression in Origin ausgewertet und  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Werte bestimmt.

Die Inhibition von NDM1 durch RNA-Aptamere wurde ebenfalls mit dem Nitrocefin-Test durchgeführt. Dabei wurde aufgrund der hohen Probenzahl allerdings ähnlich wie in der Filterretention in 96-well Microtiterplatten gearbeitet, das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Zunächst wurden 30 nM NDM1 mit RNA der Konzentrationen von 1 µM bis 30 µM für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µM Nitrocefin gestartet. Die Produktkonzentration wurde im Tecan Plattenleser photometrisch bei 486 nm Absorption alle 5' für zwei Stunden ausgelesen. Es wurden Dreierwerte bestimmt, das Probenvolumen betrug 100 µl. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden wie bereits beschrieben berechnet.

## 6.6 $\beta$ -Galactosidase Aktivitätstest

Die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität wurde durch die Umsetzung des farblosen Substrats ONPG in Galaktose und gelbes o-Nitrophenol gemessen. Dieses absorbiert Licht der Wellenlänge 420 nm und kann photometrisch bestimmt werden. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Lysat frischer Bakterienkulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Generell dient der Aktivitätstest dazu, die  $\beta$ -Galactosidase-Expression zu messen um dadurch eine genetische Schalteraktivität zu bestimmen.

### 6.6.1 Klassische Methode in *E. coli*

Die klonierten Reporter-gen-Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm WH207 transformiert, auf selektivem LB-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Von den erhaltenen Transformanten wurde eine Kolonie auf LB-Festmedium vereinzelt und wiederum bei 37°C über Nacht inkubiert. Übernachtskulturen (ÜNK) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und 40 µl davon in eine 4 ml Übertagkultur (ÜTK) überimpft. Diese wurde bis zur gewünschten  $OD_{600}$  bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Durch Abkühlen auf 4°C mittels Eiswasser wurde das Wachstum gestoppt.

Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  wurde ein Aliquot (30 - 150 µl) der Bakteriensuspension aus der Meßküvette entnommen und zur Zelllyse in vorbereitete Glasröhrchen gegeben. Diese enthielten

200 µl 5x LacZ-Puffer, 50 µl Chloroform, 25 µl 0,1% SDS und 800 µl LB. Es wurden Ansätze ohne Zellen als Blindwerte mitgeführt. Nach Schütteln und Temperaturangleichung für 30' bei 28°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in 1x LacZ-Puffer) gestartet. Die Proben wurden bei 28°C bis zu einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Nachdem sich das Chloroform abgesetzt hatte, wurde 1 ml jeder Proben in Küvetten überführt und die Extinktion bei 420 und 550 nm bestimmt. Es wurden drei unabhängige Messungen parallel durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Als Maß für die β-Galactosidase-Aktivität wurden die Miller Einheiten (MU) nach Formel 1 berechnet (169):

$$MU = \frac{oD_{420} - (1,754 \times oD_{550})}{oD_{600} \times V \times t}$$

**Formel 1:** U: Units nach Miller; oD420: Absorption von o-Nitrophenol; oD550: Absorption durch Zelltrümmer; oD600: Zelldichte; t: Dauer der Reaktion in Minuten; V: Volumen in ml; 1,754: Korrekturfaktor für die Lichtstreuung durch Zelltrümmer bei oD420

### 6.6.2 Hochdurchsatzmethode in *E. coli* (96well)

Die Hochdurchsatzvariante der β-Galactosidase-Messung wurde am Lehrstuhl für Genetik in Erlangen entwickelt (7). Die Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm WH207 transformiert, auf selektivem LB-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Von den erhaltenen Transformanten wurde eine Kolonie auf selektivem LB-Festmedium vereinzelt und wiederum bei 37°C über Nacht inkubiert. 1 ml ÜNK wurden in 96-deep well Platten mit einer Einzelkolonie beimpft und mit einer sterilen Membran abgedeckt bei 37°C auf einem Thermomixer bei 800 rpm über Nacht geschüttelt. 20 µl der ÜNK wurden in eine vorgewärmte 1 ml ÜTK in 96-deep well Platten überimpft. Steril abgedeckt wurde die ÜTK bis zu einer oD600 von 0.4 bei 37°C auf dem Thermomixer geschüttelt. Durch Abkühlen auf Eiswasser wurde das Wachstum gestoppt.

Nach kurzem Resuspendieren wurde die oD600 der Kulturen im Tecan-Plattenleser bestimmt. Ein Aliquot von 60 µl wurde aus der 96-deep well Platte entnommen und zur Zelllyse in eine vorbereitete 96-deep well Lyseplatte gegeben. Diese enthielten pro well 340 µl 1x Z-Puffer und 35 µl Chloroform. Es wurden Ansätze mit Medium als Blindwerte mitgeführt. Die Zellen wurden durch Schütteln in der Chloroform-Lösung für 30 s bei 1400 rpm auf dem Thermomixer lysiert. Das Zelllysate wurde dann 30' bei 28°C zur Phasentrennung äquilibriert. Aus der Lyseplatte wurde in 45 s-Abständen 50 µl Zellsuspension mit einer 8-Kanalpipette entnommen und in eine 96well-Platte mit 270 µl 1 mg/ml ONPG-Lösung in 1x Z-Puffer (kurze Platte) überführt, durch zweimaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und davon 160 µl in eine zweite 96well-Platte (lange Platte) überführt, um die

Enzymreaktion zu starten. Die kurze Platte wurde bei 28°C 10' inkubiert und die Reaktion anschließend durch zweimaliges Auf- und Ab-Pipettieren von 75 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die lange Platte wurde bei 28°C 1,5-2 h inkubiert und dann ebenfalls mit 75 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Von beiden 96well-Platten wurde dann im Tecan-Plattenleser die Extinktion bei 420 und 550 nm bestimmt. Als Maß für die β-Galactosidase-Aktivität wurden die Miller-Einheiten nach Formel 1 berechnet. Die Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Excel unter Berücksichtigung der Aktivitäten von kurzer und langer Platte. Es wurden je drei unabhängige Messungen parallel durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

### 6.6.3 Klassische Methode in *B. subtilis*

Es wurde eine abgewandelte Version der klassischen Methode in *E. coli* in Reagenzgläsern durchgeführt, da die Hochdurchsatzmethode mit Kultivierung in 96-well *deep well* Platten keine ausreichende Sauerstoffversorgung für *B. subtilis* gewährleistete. Die untersuchten *B. subtilis* Stämme wurden auf LB-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Flüssigkulturen wurde in CSK-Medium verwendet. Von Platte wurden 4 ml Übernachtskulturen angesetzt, die bei 37°C und 150 rpm geschüttelt wurden. Am nächsten Morgen wurde die Übertagkultur auf oD600 0,03 angeimpft und 5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Das Wachstum wurde durch Inkubation in Eiswasser abgestoppt und die Zelldichte durch Absorptionsmessung bei oD600 bestimmt. Die durchschnittliche oD600 der Übertagkultur betrug 0,5.

Ein Reaktionsansatz bestand aus 900 µl Z-Puffer mit 10 µl Lysozymlösung (1 mg/ml), die bei 28°C äquilibriert wurden. Dazu wurden jeweils 100 µl der gestoppten Übertagkultur gegeben, geschüttelt und 20' inkubiert um die Zellwände mit Lysozym anzuverdauen. Durch Zugabe von 10 µl Triton-X, Schütteln und weitere 10' Inkubation wurden die Zellen lysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet und nach Einsetzen einer leichten Gelbfärbung durch 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (1 M) gestoppt. Die Reaktionszeiten sowie die oD420- und oD500-Werte wurden gemessen, die β-Galactosidase-Aktivität in Miller Units nach Formel 1 berechnet.

## 6.7 Standardmethoden

Als molekularbiologische Standardmethoden werden tägliche Laborroutinen bezeichnet. Diese wurden nach Sambrook *et al.* durchgeführt. Hierzu zählten Klonierungsmethoden wie Restriktionsverdau und Ligation von Plasmiden sowie deren Transformation nach CaCl<sub>2</sub>-Methode in *E. coli*. Weiterhin zählten auch Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Fällung von Nukleinsäuren

dazu. Spezielle molekularbiologische Protokolle zum Beispiel in der *in vitro* Selektion sind im jeweiligen Methodenteil gesondert beschrieben. Weitere Methoden wurden mit Hilfe von Qiagen Kits durchgeführt. Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren wurde das PCR Purification Kit oder das Gel Extraction Kit verwendet. Plasmide wurden mit dem Miniprep Kit oder größere Mengen mit dem Maxiprep Kit aus *E. coli* isoliert. Alle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

### 6.8 Transformation in *B. subtilis*

Die Transformation von *B. subtilis* fällt nicht unter molekulare Standardmethoden, da es eine Vielzahl verschiedener Protokolle und Strategien gibt. In diesem Fall wurde eine Methode mit Hochsalz (HS)/Niedrigsalz (LS)-Bedingungen angewandt (170). Die Plasmide wurden nach Transformation ins Genom am amyE-Lokus integriert. Bei -80°C gefrorene *B. subtilis* 168 Zellen wurden auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von Platte wurden 4 ml Vorkulturen in HS-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkulturen (20 ml LS-Medium) wurden mit 2 ml Vorkultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 kultiviert. Dann wurde 1 ml der Hauptkultur jeweils mit 1 µg Plasmid-DNA in einem 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt und weitere zwei Stunden bei 37°C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Schließlich wurde die Kultur durch Zentrifugation bei 13000x g für 1' sedimentiert, in 150 µl Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit 5 µg/ml Chloramphenicol ausgebracht. Gewachsene Kolonien wurden auf Integration des Plasmid durch Kolonie-PCR geprüft. Positive Kolonien wurden in LB<sup>cm</sup> bei 37°C unter Schütteln über Nacht kultiviert. 500 µl der Kulturen wurden dann mit 20% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 7 Anhang

### 7.1 Erste *in vitro* Selektion

Tabelle 13: Zusammenfassung aller Runden der ersten Selektion gegen TEM1

Runde	Template	RNA Pool	Vorsäule				Hauptsäule				Amplifikation	Puffer
	aus Runde	nmol	Σ W	Σ E	Säule	W1 Vorsäule	TEM-1	Σ W	Σ E	Säule	PCR	[KPosphat]
			% der Gesamtaktivität			nmol	nmol	% der Gesamtaktivität			Runden	M
1.1	NC-Pool	0.54 in 2	-	-	-	-	5,00	99,23	0,57	0,20	12	0,1
1.2	NC-Pool	0.54 in 5	-	-	-	-	10,00	97,14	2,60	0,26	12	0,1
1.3	NC-Pool	1 in 2.3	-	-	-	-	5,00	99,80	0,15	0,05	12	0,1
2.1	1.3	0,18	99,74	0,18	0,08	0,13	0,70	99,50	0,36	0,14	12	0,1
2.2	1.3	1,8	99,96	0,03	0,01	1,20	2,50	99,92	0,07	0,01	12	0,1
3.1	2.2	0,68	99,90	0,08	0,02	0,65	1,30	99,91	0,08	0,02	12	0,1
4.1	3.1	0,2	99,29	0,51	0,20	0,16	0,31	99,42	0,45	0,13	12	0,1
5.1	4.1	1	98,42	1,55	0,03	0,50	1,60	98,78	1,20	0,02	12	0,1
6.1	5.1	0,338	98,32	1,58	0,10	0,23	0,99	92,33	7,53	0,13	6	0,1
6.2	5.1	0,64	94,38	5,54	0,08	0,27	0,76	94,23	5,70	0,08	-	0,2
6.3	5.1	0,64	93,57	6,31	0,13	0,30	0,76	92,08	7,76	0,17	-	0,2
6.4	5.1	0,43	96,16	3,62	0,22	0,25	0,76	94,74	5,21	0,06	6	0,2
7.1	6.4	0,27	91,46	8,41	0,14	0,12	0,76	85,81	13,99	0,21	-	0,2
7.2	6.1	1,4	92,36	7,39	0,25	0,51	1,90	85,99	13,61	0,40	6	0,2
7.3	6.1	1,4	92,71	7,12	0,17	0,50	3,80	83,42	15,70	0,88	7	0,2
7.4	6.1	0,7	71,71	17,46	0,74	-	0,70	86,56	12,90	0,54	5	0,2
7.5	6.1	0,87	95,51	4,46	0,03	0,39	2,85	77,55	22,33	0,12	9	0,1
7.6	6.1	0,87	93,01	6,97	0,03	0,42	2,85	83,29	16,58	0,13	9	0,1
8.1	7.5	4,3	96,20	3,77	0,04	2,83	3,80	82,28	17,71	0,01	8	0,1
8.2	7.6	3,6	95,51	4,47	0,02	1,77	3,80	82,14	17,83	0,03	8	0,1
8.3	7.5	1,9	94,70	5,29	0,01	1,26	1,90	84,43	15,49	0,08	7	0,05
9.1	8.1	0,8	97,04	2,86	0,09	0,52	1,90	83,50	16,33	0,16	7	0,1
9.2	9.1	0,26	91,62	8,24	0,14	0,14	1,90	88,71	11,18	0,11	7	0,1
10.1	9.1	1,6	94,74	5,23	0,03	1,23	1,90	82,42	17,58	0,00	7	0,05

## Anhang

Tabelle 14: Auflistung der Einzelsequenzen aus der ersten Selektion

Name	Sequenz	Häufigkeit
7.01	GAGGATGGCGCCACGTTGGAAGTGGGGTTTAGCATGCAGGTGGTAGTGG	1
7.02	TTGCTGTGCTCCCTGGCGGGATCAAGGGTAAACCTGACATGGTGTTCAC	3
7.03	AGTCACGAAGCCTATTGCTGATTAGAGCGCACGATGCGTCACACGACACG	1
7.06	GACCTAGGTCCATAACGCGCTGGTCTATCAAGTGTATTACGTGGCACA	5
7.08	CACTGTCTATCGTGCAGCCGGTCTCTATGAAGGCACGTCGGTGTAGCAGG	1
7.09	TGACATCCAGAATTCACACGGGGTGGGGCATGGGACTAGGTCAGAAGTGC	2
7.10	CACGCACTTAGCGAATTCATTGGTATGTATTAACCTATGGCAGGGGGCGC	1
7.11	CGGATCAGTACAAATCGAATGCTATGACCATGCACCTCTGCATTCAAGC	1
7.12	CCTGAAGGGATCAAGGGAAGAATCGCACATTTAAAAGTGGCTTGACATC	1
7.13	GCGGTATAACCAAGGCACACGACAACGATGAGGAGGATAGTGGGTGGACT	1
7.14	TATGTCGAATCTCAGCAGGCAGGTCGTGTTGACACTGCTGTAGCTGTGCG	1
7.15	ACAGAGGCAAGGCGATCACGAACGCGTGGGTATGCGGAGGGCGGTCAAAG	1
7.17	GGTGTAACTCTGTAGCCAGGACATGAACGGGCGGGAGGTATGAAGATG	1
7.19	GGAGACAACTGGTTACCACGAACAAGGGAAGGGCGGTATGCGTATATGG	1
7.20	CAACATCTGGCGGTCCAACGGTAAGCACATGTGACAGTACAAATACATAGC	4
9.01	GTGGCGGAAGGCATGCACTAGACTCACAGTGAGGCGTGGGCGGTGAGGA-	1
9.02	GCAGGTAACAGAGCTGGCGAATCCTATGGCATGTGACGGAGCCAATTTA	2
9.06	GACGGTCGGATATCATTGGATCAAAATCTGAAACATTTCCACATATAGC	1
9.08	GACGGTTGGATATCATTGGATCAAAATCTGAAAAGTACAAATACATAGC	1
9.11	GAGATATTAGGCGCCACAGAGACAAGGGATGAGGATTCAGGGACACAAGG	2
9.14	CCCGTGGATGATGGGTATACTCAGTATCAACGTAAAGTACAAATATAAGC	1
9.16	GAACAGACGCTTGGCGTATCGACTGTAGCCGGTCTATCAGCAGGTCAATG	1
9.18	TACAACTCACCCTCGAAATTGGGAGGCGTGGATGGTGGCTCGGTTGAT	2
9.19	ATGTTTTCTACGGAGTTACCTGACGCTATCCTTAAAGTACAAAGTGATGC	1

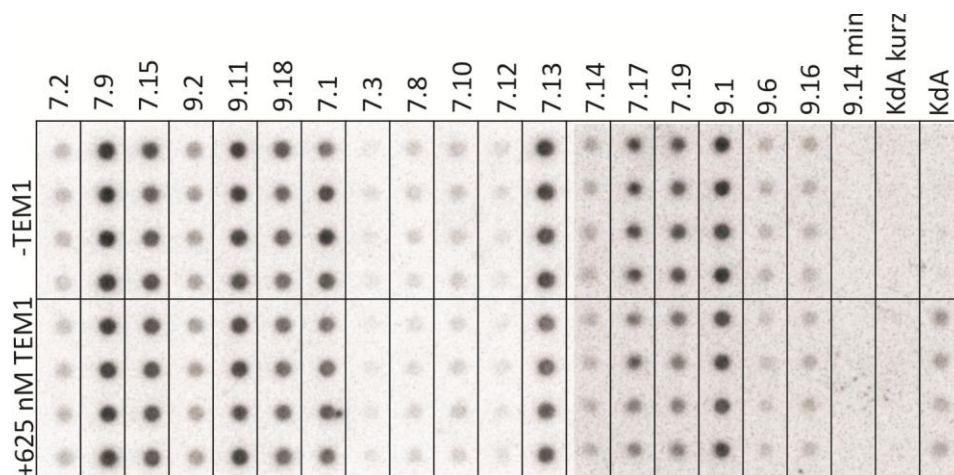


Abbildung 28: Auswertung der Einzelsequenzen durch Filterretention: Pro Spalte wurde eine Sequenz aufgetragen. KdA ist eine Variante des TetR-bindenden RNA Aptamers mit TetR Protein als Positivkontrolle des Assays. Es wurden Viererwerte aufgenommen, pro Ansatz wurde RNA mit 10 kcpm eingesetzt. Die obere Zeile ist ohne, die Untere mit 625 nM TEM1 beziehungsweise TetR in den Spalten kda.

## 7.2 Zweite *in vitro* Selektion

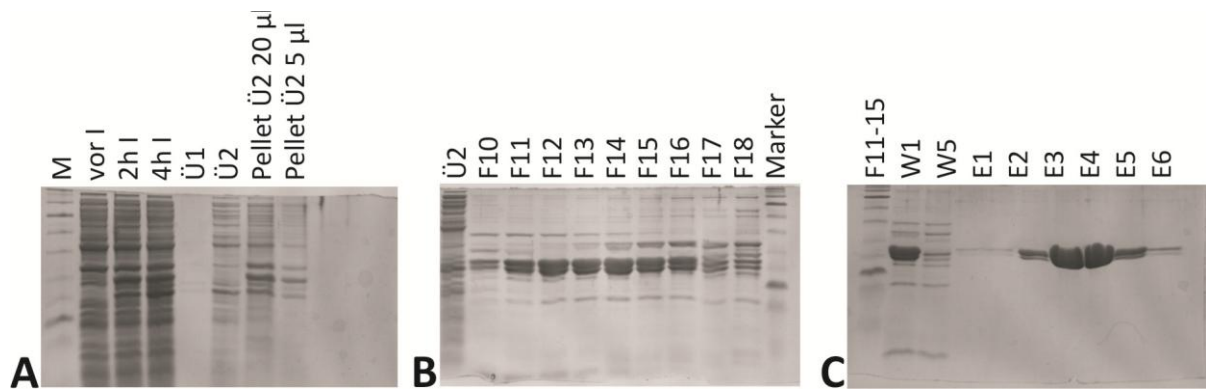


Abbildung 29: TEM1-Aufreinigung. A Überexpression für vier Stunden (vor I – 4h I), Osmotischer Schock: Ü1 Überstand mit 20% Sucrose, Ü2 Überstand nach osmotischem Schock. B Ü2 wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt und aufkonzentriert, Fraktionen F11 bis F15 zeigten die stärkste Bla-Aktivität. C TEM1 (mit N-terminalem Strep-tag) wurde abschließend über Affinitätschromatographie aus F11-15 gereinigt, über eine Strep-Tactin-Säule. Die Elution erfolgte mit Desthiobiotin.

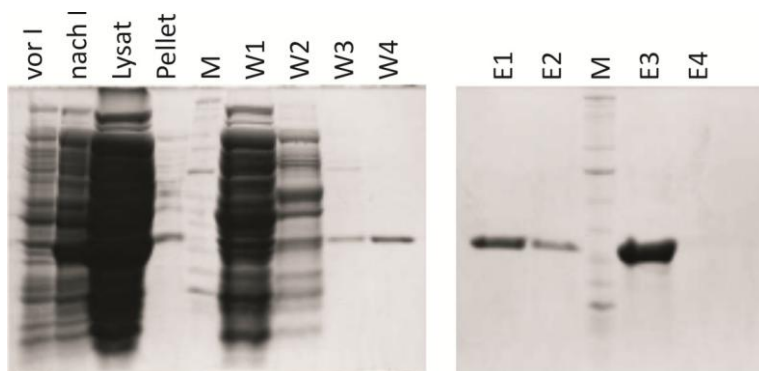
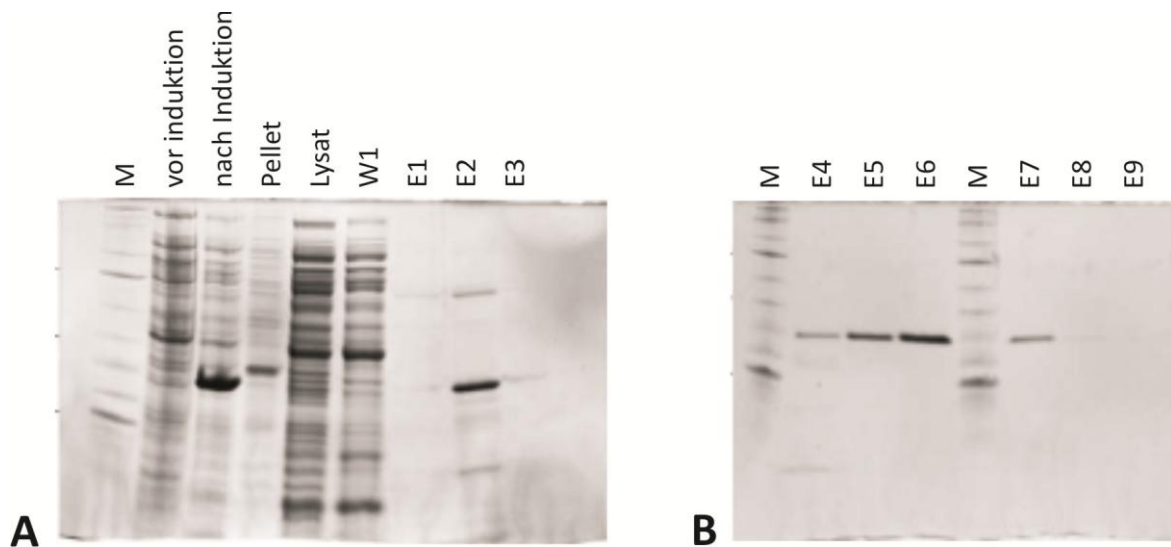
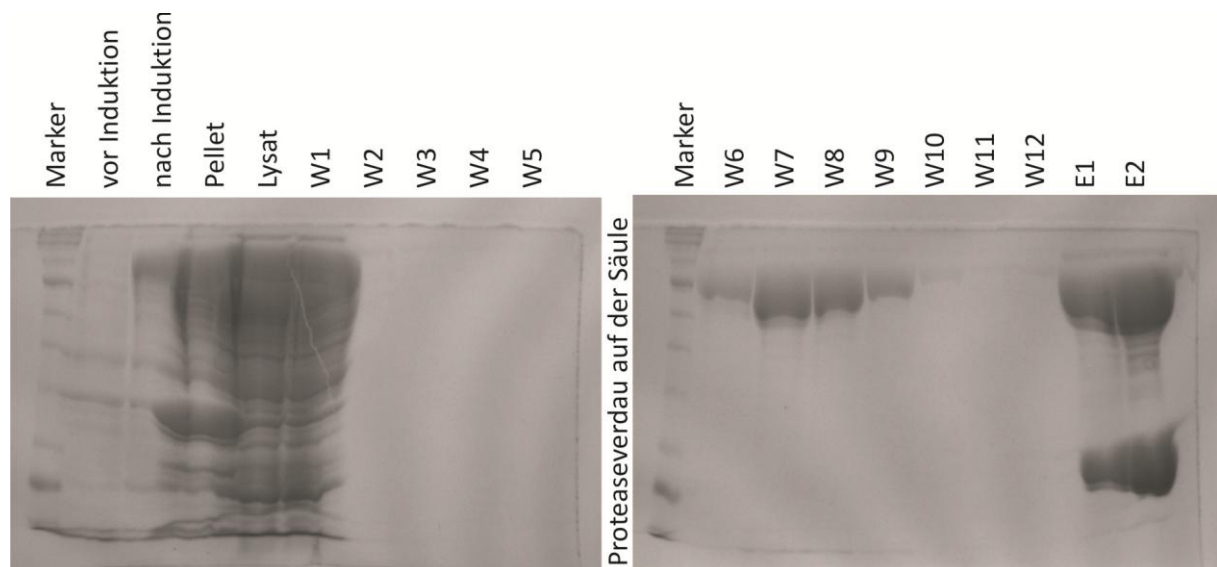


Abbildung 30: Aufreinigung der putativen  $\beta$ -Lactamase über Ni-NTA Affinitätschromatographie. Von Links nach rechts: Vor I und nach I ist vor und nach 3 h Überexpression, die Lysat-Bande ist etwas überladen, darauf folgt das Pellet nach Zellaufschluss, M Marker, W1-W4 Waschfraktionen (20 mM Imidazol), E1 und E2 Elutionsfraktionen 100 mM Imidazol, E3 und E4 200 mM Imidazol.





**Abbildung 31: Aufreinigung von MecR1 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie:** Abbildung A zeigt die Überexpression vor und nach Induktion. Von den Waschfraktionen wurde lediglich W1 aufgetragen. E2 enthält die prominente MecR1-bande. E2 wurde daher durch Dialyse von Imidazol befreit und wiederholt auf die Ni-NTA-Säule gegeben. Ergebnis der zweiten Säule ist B. E5 und E6 enthalten das aufgereinigte Protein



**Abbildung 32: Überexpression PBP2x:** Durch das höhere Molekulargewicht (60 kDa), läuft PBP2x nicht weit in das Treengel ein. Von links nach rechts: Zustand vor und nach Induktion, Zellaufschluss mit Pellet und Lysat. GSH-Affinitätschromatographie, W1-W5 Waschfraktionen. PBP2x wurde auf der Säule vom GST-tag durch Proteaseverdau getrennt. Nach 16 h Inkubationszeit wurde in W6-W9 freies PBP2x von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 mM GSH.

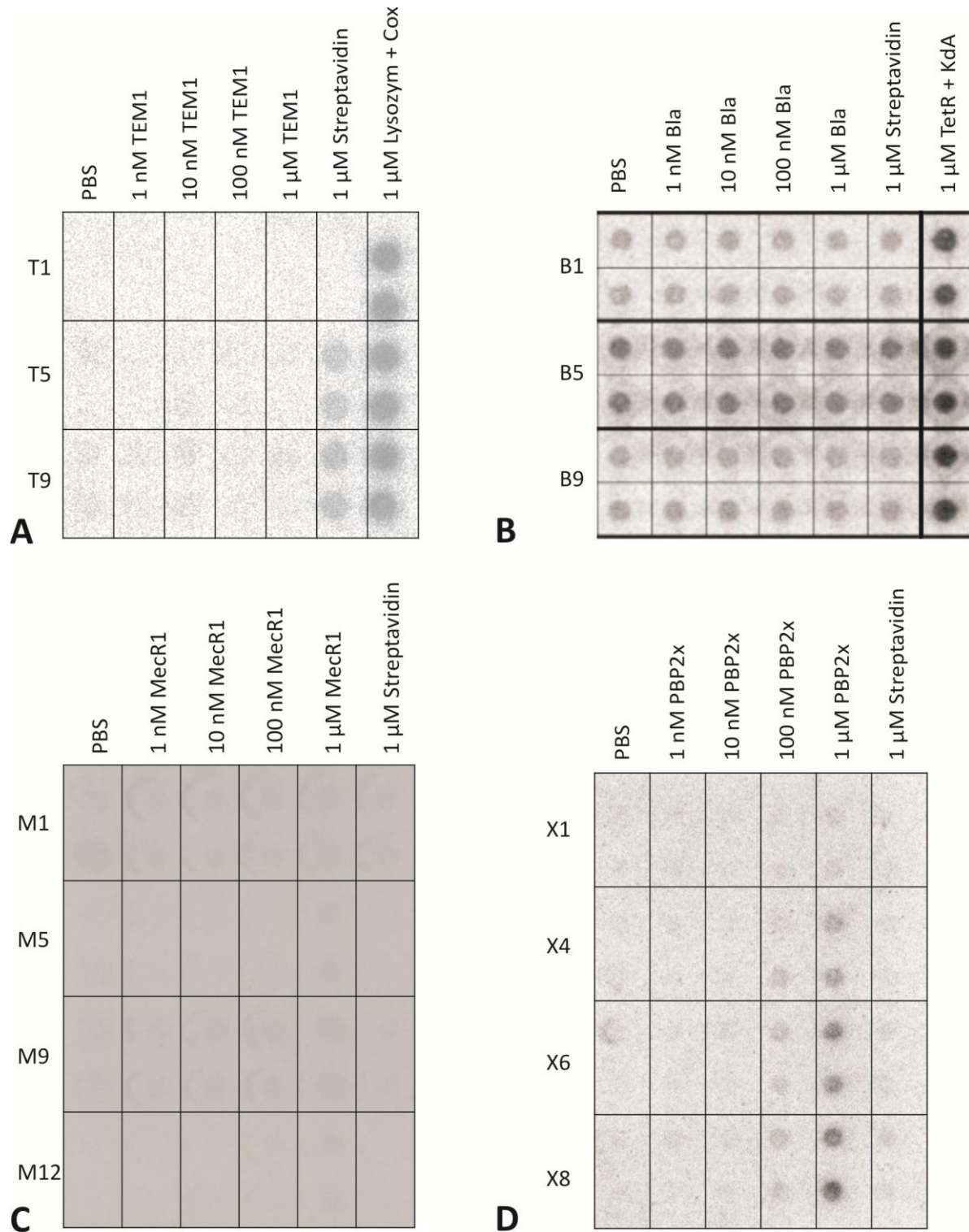


Abbildung 33: Auswertung der *in vitro* Selektionen durch Filterretentions-Analyse. A Zielprotein TEM1, ab Runde T5 ist eine Anreicherung von Streptavidin-Bindern erkennbar. Positivkontrolle war Lysozym und das Lysozym-bindende Aptamer Cox. B Zielprotein putative  $\beta$ -Lactamase (Bla). Sämtliche RNA-Pools der Selektion binden unspezifisch an die Nitrozellulose-Membran. C Zielprotein MecR1, Es konnte keine Bindung der Pools durch Filterretention nachgewiesen werden. D Zielprotein PBP2x: Es ist eine leichte Anreicherung von Runde X4 bis X8 zu erkennen, mit einem ähnlichen Profil wie der NDM1-Selex. Die Arbeit an dem angereicherten Pool von PBP2x wurde aus Zeitgründen nicht fortgesetzt.

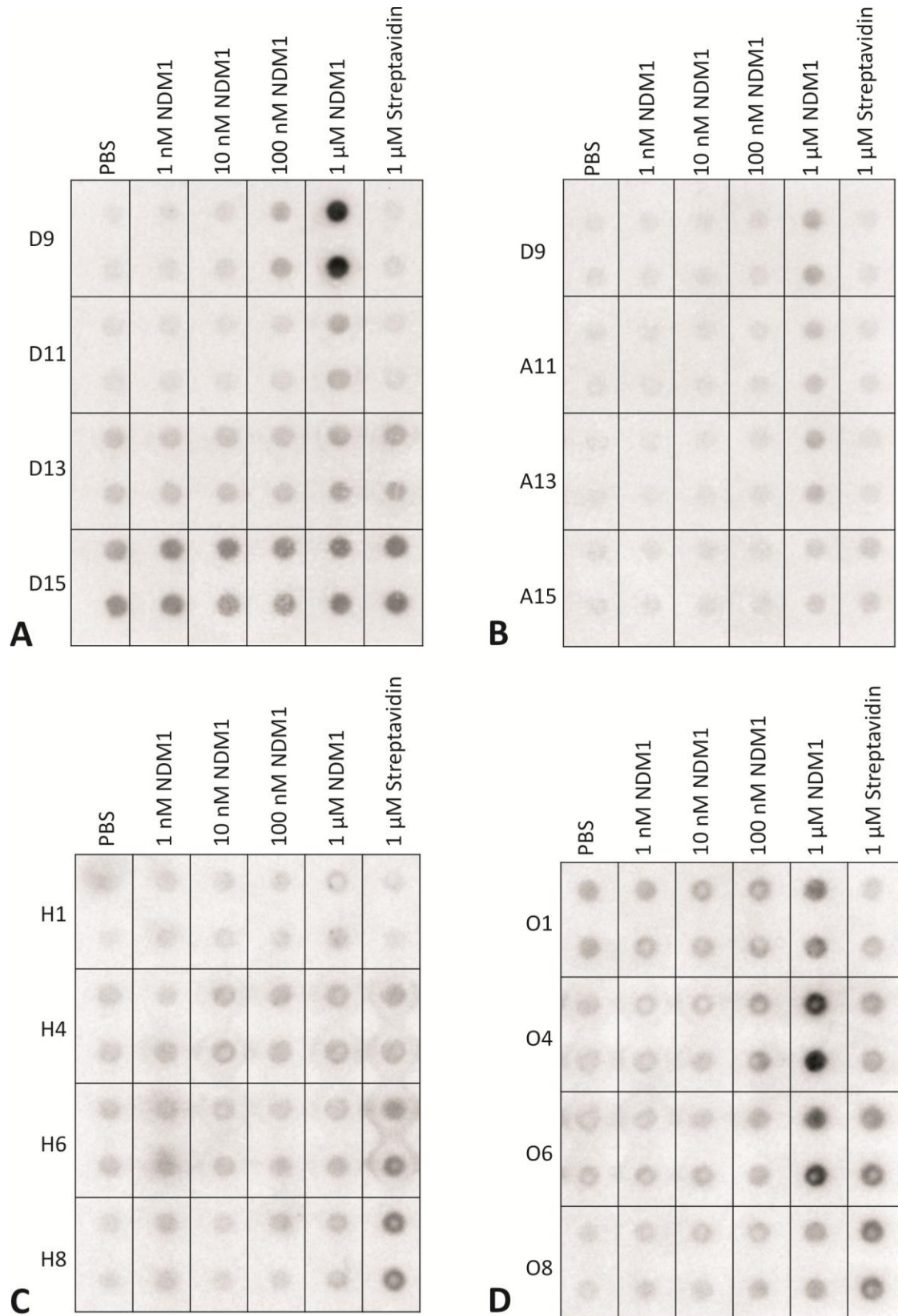
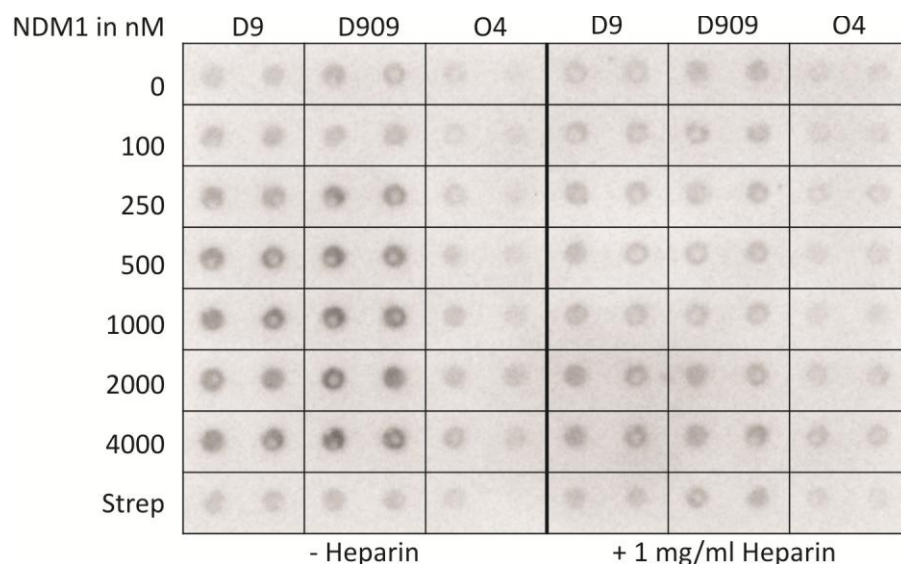


Abbildung 34: Weitere Selektionen gegen NDM1. A Fortsetzung der ersten NDM1-Selektion bis Runde 15. B wie A, mit Versuch der spezifischen Elution mit Ampicillin. C Wiederholung der NDM1-Selektion in Anwesenheit von Heparin. D *doped*-Selex mit neuem Initial-Pool auf Grundlage der NDM1-bindenden Sequenz D909.

## Anhang



**Abbildung 35:** Filterretentionsanalyse zur Konzentrationsabhängigkeit der D9-NDM1 Interaktion und dem Einfluß von Heparin. NDM wurde in Konzentrationen von 100 bis 4000 nM eingesetzt. Die unterste Zeile ist die 1 µM Streptavidin-Kontrolle. Die linken drei Spalten sind ohne, die rechten mit 1 mg/ml Heparin. Gemessen wurde die NDM1-Bindung der angereicherten Pools D9 und O4, sowie der Einzelsequenz D909.

### 7.3 RNA-Schalter

Im folgenden Abschnitt sind die Rohdaten der  $\beta$ -Galactosidase-Reportergentests tabellarisch aufgeführt. Es werden jeweils die verwendeten Plasmide oder Stämme angegeben, die Ligandenkonzentration, die Absorptionen bei 420, 550 und 600 nm. Dazu die Reaktionszeit in Minuten, das Volumen des eingesetzten Zellextrakts in µl. Aus den angegebenen Werten wurde die Aktivität in Miller Einheiten MU berechnet. Es wurden mindestens Dreierwerte bestimmt, Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

**Tabelle 15:** Rohdaten der  $\beta$ -Galactosidase-Messung des *add*-Schalters

Nr.	Plasmid	Adenin [µM]	A420	A550	oD600	t[min]	V[µl]	MU	Mittel	sd
1	pLacT1	0	1 0,048	0	0,414	13	50	178,4	154,8	20,5
			2 0,039	0	0,414	13	50	144,9		
			3 0,038	0	0,414	13	50	141,2		
2	pLacT1	50	1 0,03	0	0,393	13	50	117,4	131,8	18,5
			2 0,032	0	0,393	13	50	125,3		
			3 0,039	0	0,393	13	50	152,7		
3	pLacT1	250	1 0,032	0	0,417	13	50	118,1	137,7	25,1
			2 0,035	0	0,417	13	50	129,1		
			3 0,045	0	0,417	13	50	166,0		
4	pLacT1	500	1 0,039	0	0,45	13	50	133,3	100,3	88,5
			2 0,049	0	0,45	13	50	167,5		
			3	0	0,45	13	50	0,0		
5	pLacT1	1000	1 0,046	0	0,475	13	50	149,0	127,4	24,7
			2 0,041	0	0,475	13	50	132,8		
			3 0,031	0	0,475	13	50	100,4		
6	pLacT1	2000	1 0,035	0	0,345	13	50	156,1	148,6	12,9
			2 0,03	0	0,345	13	50	133,8		

# Anhang

7	pWH948 add	0	3	0,035	0	0,345	13	50	156,1	2082,3	148,4
			1	0,582	0	0,413	13	50	2168,0		
			2	0,582	0	0,413	13	50	2168,0		
8	pWH948 add	50	3	0,513	0	0,413	13	50	1911,0	2142,5	200,1
			1	0,516	0	0,354	13	50	2242,5		
			2	0,523	0	0,354	13	50	2272,9		
9	pWH948 add	250	3	0,44	0	0,354	13	50	1912,2	2427,9	69,5
			1	0,676	0	0,418	13	50	2488,0		
			2	0,639	0	0,418	13	50	2351,9		
10	pWH948 add	500	3	0,664	0	0,418	13	50	2443,9	2307,2	173,0
			1	0,85	0	0,555	13	50	2356,2		
			2	0,763	0	0,555	13	50	2115,0		
11	pWH948 add	1000	3	0,884	0	0,555	13	50	2450,5	2280,6	248,0
			1	0,658	0,003	0,455	13	50	2207,1		
			2	0,758	0,001	0,455	13	50	2557,0		
12	pWH948 add	2000	3	0,618	0,002	0,455	13	50	2077,7	2755,7	93,9
			1	0,696	0,002	0,376	13	50	2833,4		
			2	0,648	0	0,376	13	50	2651,4		
13	pWH948 NheI AfIII	0	3	0,68	0	0,376	13	50	2782,3	5457,5	450,6
			1	0,934	0	0,248	13	50	5794,0		
			2	0,806	0,005	0,248	13	50	4945,6		
14	pWH948 NheI AfIII	50	3	0,908	0	0,248	13	50	5632,8	5373,5	677,8
			1	1,19	0,011	0,368	13	50	4894,3		
			2	1,4	0	0,368	13	50	5852,8		
15	pWH948 NheI AfIII	250	3			0,368	13	50	0,0	4933,8	548,0
			1	1,11	0,013	0,386	13	50	4333,2		
			2	1,27	0	0,386	13	50	5061,8		
16	pWH948 NheI AfIII	500	3	1,36	0,002	0,386	13	50	5406,5	4511,7	948,0
			1	1,21	0,011	0,463	13	50	3956,5		
			2	1,71	0,013	0,463	13	50	5606,2		
17	pWH948 NheI AfIII	1000	3	1,22	0,014	0,463	13	50	3972,2	5067,3	851,4
			1	1,59	0,005	0,44	13	50	5528,8		
			2	1,17	0,001	0,44	13	50	4084,8		
18	pWH948 NheI AfIII	2000	3	1,6	0,001	0,44	13	50	5588,3	5094,4	792,6
			1	1,33	0,005	0,381	13	50	5335,1		
			2	1,06	0,01	0,381	13	50	4209,4		
			3	1,43	0,005	0,381	13	50	5738,9		

# Anhang

Tabelle 16: Rohdaten zur  $\beta$ -Galactosidase-Messung der modifizierten *add*-Schalter

Nr.	Plasmid	Adenin [mM]		A420	A550	oD600	t[min]	V[ $\mu$ l]	MU	Mittel	SD
1	pLacT1	0	1	0,025	0,010	0,4	6,5	50	58,7	22,7	49,3
			2	0,032	0,021	0,4	6,5	50	-33,5		
			3	0,020	0,008	0,4	6,5	50	43,0		
2	pWH948 20add18	50	1	0,175	0,003	0,21	6,5	50	2474,9	2585,6	172,8
			2	0,194	0,002	0,21	6,5	50	2784,8		
			3	0,171	0,000	0,21	6,5	50	2497,1		
3	pWH948 20add18	100	1	0,406	0,004	0,42	6,5	50	2922,4	2775,4	206,3
			2	0,406	0,009	0,42	6,5	50	2864,2		
			3	0,384	0,021	0,42	6,5	50	2539,5		
4	pWH948 20add18	200	1	0,469	0,014	0,41	6,5	50	3336,0	3086,0	248,3
			2	0,400	0,012	0,41	6,5	50	2839,5		
			3	0,428	0,010	0,41	6,5	50	3082,4		
5	pWH948 20add18	300	1	0,373	0,008	0,38	6,5	50	2903,8	2980,7	70,8
			2	0,381	0,006	0,38	6,5	50	2995,0		
			3	0,384	0,004	0,38	6,5	50	3043,3		
6	pWH948 20add18	500	1	0,328	0,015	0,4	6,5	50	2320,0	2484,3	210,4
			2	0,372	0,010	0,4	6,5	50	2721,4		
			3	0,314	0,000	0,4	6,5	50	2411,4		
7	pWH948 20add9	50	1	0,559	0,015	0,21	6,5	50	7787,4	7543,7	268,2
			2	0,526	0,017	0,21	6,5	50	7256,3		
			3	0,453	-0,037	0,21	6,5	50	7587,3		
8	pWH948 20add9	100	1	1,038	-0,030	0,39	6,5	50	8604,6	8738,0	566,0
			2	1,188	0,001	0,39	6,5	50	9358,7		
			3	1,154	0,062	0,39	6,5	50	8250,6		
9	pWH948 20add9	200	1	1,334	-0,017	0,38	6,5	50	11043,9	10198,5	1248,2
			2	1,344	0,007	0,38	6,5	50	10786,8		
			3	1,175	0,053	0,38	6,5	50	8764,8		
10	pWH948 20add9	300	1	1,358	-0,015	0,37	6,5	50	11515,9	10710,8	862,2
			2	1,191	0,007	0,37	6,5	50	9801,1		
			3	1,304	0,002	0,37	6,5	50	10815,4		
11	pWH948 20add9	500	1	1,436	-0,043	0,41	6,5	50	11338,2	12062,5	741,9
			2	1,685	-0,013	0,41	6,5	50	12820,8		
			3	1,617	0,008	0,41	6,5	50	12028,7		
12	pWH948 NheI AfIII	0	1	0,883	0,026	0,4	6,5	50	6438,0	7176,6	1022,8
			2	1,041	-0,025	0,4	6,5	50	8344,0		
			3	1,015	0,078	0,4	6,5	50	6747,8		

# Anhang

**Tabelle 17: Rohdaten zur  $\beta$ -Galactosidase-messung des *pbuE*-Schalters**

oD 600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2093	0,2183	0,211	0,1955	0,2141	0,1988	0,1712	0,2326	0,2271	0,2038	0,2126	0,2074
B	0,2195	0,2235	0,2178	0,1962	0,2035	0,2221	0,2157	0,2127	0,1964	0,1672	0,2117	0,1957
C	0,2186	0,2274	0,2301	0,2245	0,2308	0,234	0,2214	0,2266	0,2263	0,2059	0,2207	0,2188
D	0,2089	0,2286	0,2276	0,2163	0,2317	0,2436	0,2175	0,2275	0,223	0,2055	0,22	0,218
E	0,0457	0,2268	0,2278	0,214	0,218	0,2277	0,1843	0,2013	0,1994	0,1757	0,1762	0,1846
F	0,0469	0,2214	0,2247	0,2007	0,2153	0,2251	0,1804	0,1957	0,1984	0,1708	0,1716	0,1813
G	0,0462	0,2195	0,2221	0,2105	0,2129	0,2208	0,1362	0,194	0,1957	0,1655	0,1704	0,1788
H	0,0468	0,2225	0,2241	0,2042	0,2109	0,2208	0,1785	0,1889	0,1789	0,1665	0,172	0,18
oD 420 kurz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0479	0,1531	0,2289	0,0467	0,1357	0,2479	0,0451	0,1111	0,3387	0,0466	0,1419	0,2968
B	0,0488	0,1363	0,1984	0,0469	0,1379	0,2125	0,0485	0,1257	0,3426	0,0462	0,13	0,3192
C	0,0487	0,1551	0,2208	0,0524	0,1559	0,2789	0,0507	0,141	0,3608	0,0415	0,1424	0,4024
D	0,0551	0,1527	0,209	0,0488	0,1561	0,2766	0,049	0,1482	0,3563	0,0446	0,1445	0,3821
E	0,0677	0,1556	0,2442	0,0535	0,1501	0,3241	0,0468	0,1359	0,388	0,0604	0,131	0,4203
F	0,0513	0,1555	0,243	0,0497	0,1486	0,3108	0,0479	0,1339	0,382	0,0473	0,1267	0,3897
G	0,0624	0,1572	0,2358	0,0482	0,1413	0,309	0,0474	0,1269	0,3383	0,0489	0,1241	0,3808
H	0,05	0,1591	0,2352	0,0494	0,1368	0,2874	0,0529	0,1255	0,3216	0,0498	0,1589	0,3423
oD 550 kurz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0306	0,0317	0,034	0,035	0,0342	0,0356	0,036	0,0362	0,0353	0,0596	0,0385	0,0423
B	0,0336	0,0363	0,0342	0,0302	0,0329	0,0351	0,0362	0,0368	0,0362	0,0374	0,0393	0,0377
C	0,0347	0,0356	0,0356	0,0349	0,0346	0,0371	0,0352	0,0376	0,0383	0,0355	0,0366	0,039
D	0,0367	0,0362	0,0351	0,0352	0,0381	0,0393	0,0385	0,0432	0,0403	0,038	0,0361	0,0384
E	0,0381	0,0378	0,0391	0,039	0,0361	0,0443	0,0326	0,036	0,0387	0,0377	0,0364	0,0369
F	0,0353	0,0352	0,037	0,0362	0,0375	0,0323	0,0364	0,0369	0,0391	0,0359	0,0382	0,0365
G	0,0368	0,0378	0,0389	0,0319	0,0362	0,0329	0,0351	0,0395	0,0369	0,0404	0,037	0,0375
H	0,0361	0,037	0,0358	0,0323	0,0295	0,04	0,0362	0,0367	0,0432	0,0404	0,0372	0,0375
oD 420 lang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0479	0,1531	0,2289	0,0467	0,1357	0,2479	0,0451	0,1111	0,3387	0,0466	0,1419	0,2968
B	0,0488	0,1363	0,1984	0,0469	0,1379	0,2125	0,0485	0,1257	0,3426	0,0462	0,13	0,3192
C	0,0487	0,1551	0,2208	0,0524	0,1559	0,2789	0,0507	0,141	0,3608	0,0415	0,1424	0,4024
D	0,0551	0,1527	0,209	0,0488	0,1561	0,2766	0,049	0,1482	0,3563	0,0446	0,1445	0,3821
E	0,0677	0,1556	0,2442	0,0535	0,1501	0,3241	0,0468	0,1359	0,388	0,0604	0,131	0,4203
F	0,0513	0,1555	0,243	0,0497	0,1486	0,3108	0,0479	0,1339	0,382	0,0473	0,1267	0,3897
G	0,0624	0,1572	0,2358	0,0482	0,1413	0,309	0,0474	0,1269	0,3383	0,0489	0,1241	0,3808
H	0,05	0,1591	0,2352	0,0494	0,1368	0,2874	0,0529	0,1255	0,3216	0,0498	0,1589	0,3423
oD 550 lang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0371	0,0468	0,0364	0,036	0,0356	0,0365	0,0349	0,0354	0,0374	0,0363	0,0365	0,0328
B	0,0376	0,0386	0,0368	0,0353	0,0351	0,0357	0,0346	0,0344	0,0366	0,0345	0,0366	0,0379
C	0,037	0,0403	0,0379	0,0393	0,0367	0,0364	0,036	0,0349	0,0372	0,0287	0,034	0,0486
D	0,0401	0,0362	0,0385	0,036	0,0363	0,0374	0,0362	0,0364	0,0385	0,0324	0,0367	0,0398
E	0,0443	0,0371	0,0362	0,0382	0,0357	0,0369	0,0346	0,0381	0,0379	0,0414	0,0373	0,0462
F	0,0376	0,0358	0,0363	0,036	0,0352	0,0358	0,0359	0,04	0,0351	0,0351	0,0387	0,0402
G	0,0455	0,0407	0,0391	0,0358	0,037	0,038	0,0355	0,0377	0,037	0,0361	0,0369	0,0397
H	0,0382	0,0465	0,0421	0,0373	0,0381	0,0382	0,0397	0,0388	0,038	0,0373	0,0576	0,0426

## Anhang

**Tabelle 18: Auswertung der  $\beta$ -Galactosidase-messung des *pbuE*-Schalters**

### Referenzen

oD600	Mittel	0,0464	oD420 lang	Mittel	0,0605
oD420 kurz	Mittel	0,0579	oD550 lang	Mittel	0,0414
oD550 kurz	Mittel	0,0366	Zellvolumen in Lyse ( $\mu$ l)		60

### Miller Units kurze Platte

Dauer kurze Platte (min)

90

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	239	421	-22	193	497	-37	114	619	-130	192	562
B	-9	176	334	1	218	354	-20	160	752	-43	161	686
C	-13	216	354	-6	217	464	-11	178	659	-36	192	780
D	-7	207	335	-15	204	429	-28	172	653	-39	199	739
E		209	396	-20	214	551	-12	202	843	2	224	1034
F		226	409	-19	208	576	-28	200	831	-30	208	972
G		222	391	-3	200	584	-35	171	741	-52	209	959
H		225	397	-2	219	506	-13	187	752	-49	314	836
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

### Miller Units lange Platte

Dauer lange Platte (min)

180

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-13	89	206	-13	94	247	-16	59	305	-14	100	301
B	-12	84	162	-11	104	176	-7	85	375	-13	86	343
C	-11	99	173	-11	105	233	-7	94	331	-3	101	371
D	-11	104	161	-9	105	218	-9	99	330	-7	98	367
E		106	204	-8	108	289	-11	96	423	-9	109	494
F		112	206	-9	109	281	-13	93	425	-13	103	477
G		105	195	-10	98	282	-19	90	370	-13	105	474
H		94	186	-12	92	257	-16	88	389	-15	101	405
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MW	-12	94	175	-11	102	218	-10	84	335	-9	96	345
SD	1	9	21	2	5	31	4	18	29	5	7	32
MW		104	198	-10	102	277	-15	92	402	-13	104	462
SD		7	9	2	8	14	3	3	27	3	4	39
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

### Belegungsplan der 96-well Platte

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	s	-	+	s	-	+	s	-	+	s
B				Ade	Ade	Ade	Ade	Ade	Ade	Ade	Ade	Ade
C				0,2	0,2	0,2	1	1	1	2	2	2
D												
E	-	+	s	-	+	s	-	+	s	-	+	s
F				DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP
G				0,2	0,2	0,2	1	1	1	2	2	2
H												
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

### Legende

-	pLacT1	Ade	Adenin
+	pWH948	DAP	2'-Diaminopurin
s	pWH948 pbuE	0,2/ 1/ 2	Konzentrationen in mM



# Anhang

**Tabelle 19: Rohdaten zur  $\beta$ -Galactosidasemessung der 2'dG-abhängigen Schalter in *E. coli***

oD 550 kurz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0361	0,0384	0,0369	0,042	0,038	0,038	0,0361	0,0365	0,0364	0,037	0,0362	0,0367
B	0,0367	0,0379	0,037	0,037	0,038	0,037	0,0364	0,0376	0,0362	0,0366	0,037	0,0365
C	0,0369	0,0377	0,037	0,047	0,045	0,037	0,0362	0,0369	0,0368	0,037	0,0377	0,037
D	0,0384	0,0374	0,0369	0,038	0,037	0,039	0,0366	0,0378	0,0366	0,0387	0,0385	0,0381
E	0,0366	0,0416	0,0372	0,038	0,037	0,039	0,0369	0,0376	0,0379	0,0377	0,0384	0,0379
F	0,0373	0,0379	0,0376	0,038	0,037	0,038	0,0375	0,0377	0,0375	0,0368	0,0384	0,0386
G	0,0371	0,0381	0,0379	0,038	0,037	0,038	0,0379	0,0373	0,0368	0,0384	0,0379	0,0378
H	0,0375	0,0382	0,0391	0,038	0,037	0,039	0,0375	0,0374	0,0378	0,0375	0,0377	0,0379
oD 420 lang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0447	0,1697	0,1751	0,156	0,083	0,219	0,1384	0,1707	0,0932	0,1728	0,1707	0,1617
B	0,0881	0,1924	0,1761	0,146	0,089	0,197	0,1717	0,1834	0,0875	0,1755	0,1781	0,1633
C	0,0918	0,1957	0,1999	0,159	0,084	0,192	0,1715	0,1797	0,0905	0,1936	0,1758	0,1664
D	0,0908	0,1712	0,1922	0,163	0,096	0,196	0,1828	0,1685	0,0858	0,199	0,1767	0,1763
E	0,0473	0,2127	0,1691	0,17	0,097	0,205	0,1641	0,1861	0,0919	0,17	0,1748	0,1585
F	0,0935	0,1868	0,1702	0,175	0,09	0,216	0,1633	0,1846	0,0883	0,1724	0,1667	0,166
G	0,0917	0,2124	0,1603	0,176	0,09	0,214	0,1599	0,1709	0,0879	0,1883	0,166	0,1609
H	0,096	0,1502	0,162	0,151	0,084	0,189	0,1635	0,163	0,0874	0,1912	0,1765	0,1564
oD 550 lang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0351	0,0378	0,0378	0,038	0,038	0,038	0,0365	0,0375	0,0385	0,0378	0,0369	0,036
B	0,0363	0,0375	0,0369	0,037	0,038	0,038	0,0368	0,0369	0,0369	0,0372	0,0366	0,0366
C	0,0364	0,0375	0,0367	0,037	0,037	0,038	0,0368	0,038	0,0411	0,0385	0,0374	0,0381
D	0,0364	0,0386	0,0369	0,037	0,038	0,039	0,0373	0,039	0,0377	0,0383	0,0376	0,0383
E	0,0364	0,039	0,0379	0,038	0,039	0,04	0,0371	0,0403	0,0383	0,0381	0,0375	0,0384
F	0,037	0,0366	0,0375	0,038	0,038	0,04	0,0378	0,0378	0,0372	0,0369	0,0391	0,0381
G	0,0366	0,0376	0,0403	0,038	0,038	0,039	0,0384	0,038	0,0368	0,0381	0,0379	0,0377
H	0,043	0,0374	0,0378	0,038	0,039	0,038	0,0379	0,0374	0,0381	0,038	0,0376	0,0379
oD 420 kurz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0452	0,1735	0,1807	0,175	0,075	0,222	0,1391	0,1751	0,0919	0,1793	0,1795	0,1635
B	0,0889	0,188	0,1675	0,149	0,076	0,192	0,1481	0,1827	0,0843	0,1706	0,1774	0,1667
C	0,0923	0,1967	0,1982	0,172	0,079	0,195	0,1748	0,1774	0,0869	0,1969	0,1816	0,1668
D	0,0936	0,1721	0,1887	0,175	0,083	0,199	0,1801	0,1732	0,0841	0,2045	0,1787	0,1767
E	0,0473	0,2148	0,1662	0,188	0,083	0,206	0,1664	0,1817	0,091	0,1752	0,1812	0,1598
F	0,0908	0,1898	0,1648	0,183	0,078	0,219	0,1628	0,1799	0,0876	0,1743	0,1653	0,1673
G	0,0928	0,2137	0,1624	0,19	0,08	0,221	0,1667	0,1763	0,0866	0,1902	0,1713	0,1657
H	0,0907	0,1547	0,1673	0,167	0,074	0,198	0,1718	0,1656	0,0872	0,1935	0,1791	0,1618
oD 600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0435	0,1613	0,1457	0,163	0,167	0,177	0,1519	0,1664	0,1663	0,161	0,1586	0,156
B	0,1658	0,1691	0,1599	0,165	0,174	0,173	0,1569	0,1784	0,1732	0,1628	0,1605	0,152
C	0,1692	0,1646	0,1624	0,169	0,179	0,175	0,1656	0,1773	0,1698	0,168	0,1645	0,1618
D	0,1695	0,1595	0,1653	0,174	0,17	0,176	0,165	0,1792	0,1763	0,1696	0,1637	0,1619
E	0,0437	0,1673	0,1588	0,169	0,173	0,171	0,1627	0,1782	0,1764	0,1726	0,173	0,1742
F	0,1681	0,1708	0,1618	0,172	0,17	0,179	0,1534	0,1746	0,1677	0,1722	0,1626	0,1616
G	0,1626	0,1648	0,1547	0,164	0,165	0,172	0,1595	0,1701	0,1781	0,1783	0,1757	0,1753
H	0,1621	0,1592	0,1545	0,162	0,169	0,167	0,1534	0,1726	0,1689	0,1776	0,1631	0,1683

## Anhang

**Tabelle 20: Auswertung der  $\beta$ -Galactosidasemessung der 2'dG-abhängigen Schalter in *E. coli***

### Referenzen

oD600	Mittel	0,0436	oD420 lang	Mittel	0,0460
oD420 kurz	Mittel	0,0463	oD550 lang	Mittel	0,0358
oD550 kurz	Mittel	0,0364	Zellvolumen in Lyse ( $\mu$ l)		60

Miller Units kurze Platte		Dauer kurze Platte (min)						110				
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		340	423	324	71	420	278	338	120	363	375	335
B	111	358	334	271	65	361	290	322	96	336	359	358
C	116	396	410	275	45	364	341	315	102	388	356	327
D	112	346	376	315	89	365	355	297	91	395	346	348
E		416	332	357	88	394	323	320	102	317	328	274
F	111	358	318	339	79	405	337	324	102	320	314	321
G	123	438	330	375	88	434	328	328	95	337	299	287
H	116	294	339	323	67	387	364	294	99	350	353	292
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

Miller Units lange Platte		Dauer lange Platte (min)						110				
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		330	397	290	89	408	272	320	112	339	345	331
B	109	369	356	259	98	369	353	325	98	344	361	345
C	115	392	414	283	83	349	328	314	90	371	339	318
D	112	335	383	284	118	353	357	278	89	381	343	344
E		421	335	308	111	381	314	317	101	300	314	267
F	118	354	331	315	104	390	335	333	104	313	312	317
G	120	435	309	338	109	411	305	309	96	332	284	274
H	102	283	328	277	82	362	335	286	96	341	344	276
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MW	113	360	386	296	67	377	316	318	102	371	359	342
SD	3	25	40	27	18	28	38	17	13	27	12	14
MW	117	377	330	349	80	405	338	317	100	331	323	294
SD	6	65	9	22	10	21	18	15	3	16	23	20
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

Belegung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Plasmid	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2'dG in mM	w/o	w/o	w/o	w/o	0	0	0	0	1	1	1	1
Plasmid	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2'dG in mM	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3	3
<>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ref

Plasmide	1	pWH948	3	pWH948 M
	2	pWH948	4	pWH948 C74A
	2	H		

# Anhang

Tabelle 21: Rohdaten der  $\beta$ -Galactosidase-Messung der 2'dG-abhängigen Schalter in *B. subtilis* mit 2'dG

Nr.	Plasmid	2'dG [ $\mu$ M]		A420	A550	oD600	t[ $\mu$ min]	V[ $\mu$ l]	MU	Mittel	stabw
1	pDGxpt_H	0	1	0,1070	-0,0040	0,12	105,5	100	90,1	89,9	2,6
		0	2	0,1490	-0,0040	0,16	105,5	100	92,4		
		0	3	0,1790	-0,0030	0,2	105,5	100	87,3		
2	pDGxpt_M	0	1	0,2670	-0,0010	0,64	31,5	100	133,3	136,8	8,5
		0	2	0,2750	-0,0010	0,6	31,5	100	146,4		
		0	3	0,2580	-0,0030	0,64	31,5	100	130,6		
3	pDGxpt_C74A	0	1	0,2940	0,0020	0,64	33,5	100	135,5	126,8	10,2
		0	2	0,3000	0,0030	0,68	33,5	100	129,4		
		0	3	0,1740	0,0020	0,44	33,5	100	115,7		
4	pDGxpt_wt	0	1	0,2770	0,0010	0,68	33,5	100	120,8	126,6	6,0
		0	2	0,2890	0,0010	0,68	33,5	100	126,1		
		0	3	0,2490	0,0000	0,56	33,5	100	132,7		
5	pDGxpt_H	1750	1	0,2650	0,0030	0,56	35	100	132,5	139,5	6,1
		1750	2	0,1790	-0,0010	0,36	35	100	143,5		
		1750	3	0,0980	-0,0010	0,2	35	100	142,5		
6	pDGxpt_M	1750	1	0,0480	-0,0010	0,4	106	100	11,7	11,2	0,5
		1750	2	0,0060	-0,0020	0,08	106	100	11,2		
		1750	3	0,0330	-0,0020	0,32	106	100	10,8		
7	pDGxpt_C74A	1750	1	0,1210	-0,0050	0,08	106,5	100	152,3	163,5	11,9
		1750	2	0,5200	-0,0020	0,96	31	100	175,9		
		1750	3	0,1570	-0,0050	0,28	36,5	100	162,2		
8	pDGxpt_wt	1750	1	-0,0080	-0,0070	0,2	106	100	2,0	2,0	0,1
		1750	2	-0,0080	-0,0070	0,2	106	100	2,0		
		1750	3	-0,0060	-0,0070	0,32	106	100	1,9		

Tabelle 22: Rohdaten der  $\beta$ -Galactosidase-Messung der 2'dG-abhängigen Schalter in *B. subtilis* mit Guanin

Nr.	Plasmid	Guanin [ $\mu$ M]		A420	A550	oD600	t[ $\mu$ min]	V[ $\mu$ l]	MU	mittel	Stabw
1	pDGxpt_H	0	1	0,107	0,002	0,37	45,5	100	61,5	65,6	4,5
		0	2	0,216	0,009	0,79	36	100	70,4		
		0	3	0,092	0,002	0,3	45,5	100	64,8		
2	pDGxpt_M	0	1	0,112	0,003	0,35	36,5	100	83,6	90,3	6,4
		0	2	0,065	0,002	0,185	36,5	100	91,1		
		0	3	0,167	0,003	0,46	36,5	100	96,3		
3	pDGxpt_C74A	0	1	0,171	0,003	0,42	43	100	91,8	93,8	2,2
		0	2	0,110	0,003	0,26	43	100	93,7		
		0	3	0,195	0,004	0,455	43	100	96,1		
4	pDGxpt_wt	0	1	0,120	0,003	0,3	41,5	100	92,2	92,9	2,3
		0	2	0,118	0,004	0,28	41,5	100	95,5		
		0	3	0,113	0,003	0,285	41,5	100	91,1		
5	pDGxpt_H	1750	1	0,181	-0,004	0,4	39,5	100	119,0	139,3	20,3
		1750	2	0,205	-0,004	0,385	39,5	100	139,4		
		1750	3	0,133	-0,005	0,225	39,5	100	159,5		
6	pDGxpt_M	1750	1	0,147	-0,003	0,215	37	100	191,4	169,2	26,1
		1750	2	0,149	-0,004	0,24	37	100	175,7		
		1750	3	0,154	-0,004	0,31	37	100	140,4		
7	pDGxpt_C74A	1750	1	0,180	-0,002	0,3	35,5	100	172,3	175,5	3,9
		1750	2	0,180	-0,005	0,305	35,5	100	174,3		
		1750	3	0,175	-0,004	0,285	35,5	100	179,9		
8	pDGxpt_wt	1750	1	0,003	0,002	0,37	54	100	-0,3	1,1	1,1
		1750	2	0,001	-0,001	0,32	54	100	1,6		
		1750	3	0,001	-0,001	0,28	54	100	1,8		

# Anhang

**Tabelle 23: Rohdaten zum  $\beta$ -Galactosidasetest zur Magnesiumabhängigkeit der Hybrid-Schalteraktivität**

Nr.	Plasmid	2'dG [ $\mu$ M]	#	A420	A550	oD600	t[ $\mu$ min]	V[ $\mu$ l]	MU	middle	Stabw	MgSO <sub>4</sub> mM
1	pDGxpt_H	1750	1	0,127	0,003	0,42	28,5	100	101,7	98,2	3,9	0,5
			2	0,131	0,004	0,44	28,5	100	98,9			
			3	0,116	0,002	0,42	28,5	100	94,0			
2	pDGxpt_M	1750	1	0,017	0,001	0,23	90	100	7,4	7,1	0,3	
			2	0,019	0,003	0,222	90	100	6,9			
			3	0,017	0,002	0,214	90	100	7,0			
3	pDGxpt_C74A	1750	1	0,098	0,001	0,188	46,5	100	110,1	107,3	6,3	
			2	0,099	0,002	0,184	46,5	100	111,6			
			3	0,091	0,002	0,188	46,5	100	100,1			
4	pDGxpt_H	1750	1	0,134	0,004	0,344	46,5	100	79,4	78,2	3,8	5
			2	0,137	0,006	0,366	46,5	100	74,3			
			3	0,143	0,005	0,348	46,5	100	83,0			
			4	0,066	0,002	0,092	89	100	76,3			
5	pDGxpt_M	1750	1	0,018	0,003	0,244	89	100	5,9	5,8	0,1	
			2	0,017	0,003	0,23	89	100	5,7			
6	pDGxpt_C74A	1750	1	0,102	0,004	0,17	51,5	100	108,5	105,4	4,6	
			2	0,107	0,004	0,194	51,5	100	100,1			
			3	0,094	0,003	0,16	51,5	100	107,7			
7	pDGxpt_H	1750	1	0,046	0,001	0,06	86	100	85,7	81,8	4,3	50
			2	0,046	0,002	0,06	86	100	82,3			
			3	0,104	0,004	0,146	86	100	77,2			
8	pDGxpt_M	1750	1	0,019	0,003	0,28	88,5	100	5,5	5,6	0,1	
			2	0,023	0,004	0,33	88,5	100	5,5			
			3	0,023	0,004	0,32	88,5	100	5,6			
9	pDGxpt_C74A	1750	1	0,160	0,004	0,288	45,5	100	116,7	112,3	9,9	
			2	0,168	0,003	0,3	45,5	100	119,2			
			3	0,143	0,003	0,3	45,5	100	100,9			

**Tabelle 24: Rohdaten des  $\beta$ -Galactosidasetests zur 2'dG-Konzentrationsabhängigkeit in *B. subtilis***

Nr.	Plasmid	2'dG [ $\mu$ M]	#	A420	A550	oD600	t[ $\mu$ min]	V[ $\mu$ l]	MU	Mittel	stabw
1	pDGxpt_H	100	1	0,155	-0,001	0,588	38	100	70,2	68,8	2,1
			2	0,163	0,001	0,608	38	100	69,8		
			3	0,155	0,001	0,608	38	100	66,3		
2	pDGxpt_M		1	0,045	0,000	0,46	93,5	100	10,5	10,0	1,6
			2	0,055	0,002	0,488	93,5	100	11,3		
			3	0,020	-0,002	0,304	93,5	100	8,3		
3	pDGxpt_C74A		1	0,164	0,006	0,472	37,5	100	86,7	82,3	3,9
			2	0,126	0,000	0,42	37,5	100	80,0		
			3	0,150	0,002	0,488	37,5	100	80,1		
4	pDGxpt_H	50	1	0,156	0,001	0,588	39	100	67,3	68,5	4,5
			2	0,172	0,000	0,6	39	100	73,5		
			3	0,162	-0,001	0,648	39	100	64,8		
5	pDGxpt_M		1	0,039	0,000	0,412	91,5	100	10,3	10,5	0,9
			2	0,051	0,001	0,468	91,5	100	11,5		
			3	0,048	0,001	0,52	91,5	100	9,7		
6	pDGxpt_C74A		1	0,148	0,002	0,424	38	100	89,7	87,5	2,8
			2	0,144	0,001	0,444	38	100	84,3		
			3	0,149	0,002	0,432	38	100	88,6		
7	pDGxpt_H	25	1	0,143	0,001	0,552	39,5	100	64,8	64,7	1,6
			2	0,152	0,002	0,568	39,5	100	66,2		
			3	0,158	0,001	0,628	39,5	100	63,0		
8	pDGxpt_M		1	0,061	-0,001	0,464	89	100	15,2	16,4	1,5
			2	0,066	-0,001	0,48	89	100	15,9		
			3	0,079	0,000	0,492	89	100	18,0		
9	pDGxpt_C74A		1	0,140	0,000	0,416	38,5	100	87,4	86,1	1,4
			2	0,142	0,000	0,436	38,5	100	84,6		
			3	0,146	-0,001	0,444	38,5	100	86,4		

# Anhang

10	pDGxpt_H	10	1	0,164	0,001	0,412	53	100	74,3	73,1	1,7
			2	0,168	0,002	0,436	53	100	71,2		
			3	0,158	0,000	0,404	53	100	73,8		
11	pDGxpt_M		1	0,161	0,000	0,448	86,5	100	41,5	41,7	2,8
			2	0,156	0,001	0,4	86,5	100	44,6		
			3	0,152	0,002	0,44	86,5	100	39,0		
12	pDGxpt_C74A		1	0,139	-0,002	0,576	52	100	47,6	48,7	1,0
			2	0,142	-0,002	0,572	52	100	48,9		
			3	0,151	0,001	0,58	52	100	49,5		
13	pDGxpt_H	5	1	0,126	0,001	0,372	53,5	100	62,4	65,7	3,0
			2	0,140	-0,001	0,4	53,5	100	66,2		
			3	0,142	0,000	0,388	53,5	100	68,4		
14	pDGxpt_M		1	0,126	0,000	0,448	58	100	48,5	49,3	1,1
			2	0,133	0,005	0,424	58	100	50,5		
			3	0,123	-0,001	0,44	58	100	48,9		
15	pDGxpt_C74A		1	0,149	-0,001	0,572	53,5	100	49,3	50,5	1,1
			2	0,151	0,002	0,536	53,5	100	51,4		
			3	0,135	0,000	0,496	53,5	100	50,9		
16	pDGxpt_H	1	1	0,096	-0,002	0,296	60,5	100	55,6	62,8	6,2
			2	0,139	0,001	0,34	60,5	100	66,7		
			3	0,147	0,000	0,368	60,5	100	66,0		
17	pDGxpt_M		1	0,132	0,000	0,384	59	100	58,3	60,7	2,4
			2	0,113	0,000	0,304	59	100	63,0		
			3	0,129	0,000	0,36	59	100	60,7		
18	pDGxpt_C74A		1	0,136	0,000	0,536	53	100	47,9	49,3	1,3
			2	0,112	0,000	0,42	53	100	50,3		
			3	0,105	-0,001	0,404	53	100	49,9		

## 7.4 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
2'dG	2'-Deoxyguanosin
30S	kleine ribosomale Untereinheit
A	Adenin
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	Bacillus
C	Cytosin, Kohlenstoffatom
cDNA	komplementäre DNA (einzelnsträngig)
Cm	Chloramphenicol
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E.</i>	Escherichia, Enterococcus
EMSA	Gelverzögerungsexperiment
ESBL	beta-Lactamasen mit breitem Substratspektrum
<i>et al.</i>	et alteri
EtOH	Ethanol
G	Guanin
GFP	gün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
IC50	Mittlere inhibierende Konzentration
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>K.</i>	Klebsiella
Kan	Kanamycin
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_M$	Michaelis Menten Konstante
$k_{on}$	Affinitätsrate
LB	Luria Broth
LNA	<i>locked</i> Nukleinsäure
<i>M.</i>	Mesoplasma
MRSA	Methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N50	randomisierter Sequenzbereich
NDM1	Neu Dehli Metallo-beta-Lactamase
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleotidtriphosphat
OH	Hydroxygruppe
P	Promotor
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBD	Penicillinbindende Domäne
PBP	Penicillinbindendes Protein

## Anhang

PBS	Phosphatpuffer
PBST	Phosphatpuffer mit Detergens
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
S.	<i>Saccharomyces, Streptococcus, Staphylococcus</i>
SD	Shine-Dalgarno Sequenz
SDS	Natriumlaurylsulfat
Selex	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
ss	einzelsträngig
T	Thymin
t	Zeit
TBS	Trispuffer
Tc	Tetrazyklin
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
V.	<i>Vibrio</i>
$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

## 7.5 Einheiten und Dimensionen

Einheiten	Bedeutung	Dimensionen	Bedeutung	Faktor
% (v/v)	Volumenprozent	M	Mega	$10^6$
% (w/v)	Gewichtsprozent	k	kilo	$10^3$
°C	Grad Celsius	m	milli	$10^{-3}$
A	Ampere	$\mu$	micro	$10^{-6}$
bp	Basenpaare	n	nano	$10^{-9}$
Da	Dalton	p	pico	$10^{-12}$
g	Gravitationskraft oder Gramm	f	femto	$10^{-15}$
h	Stunde			
l	Liter			
m	Meter			
M	mol/l			
min oder '	Minute			
mol	Avogadro Zahl			
MU	Miller Einheit			
nt	Nukleotide			
oD	optische Dichte			
rpm	Umdrehungen pro Minute			
sec	Sekunde			
V	Volt			

## 7.6 Englische Ausdrücke

<b>Ausdruck</b>	<b>Übersetzung</b>
<i>array</i>	Versuchsanordnung
<i>bead</i>	Kügelchen
<i>body labeling</i>	radioaktive Markierung des RNA-Rückgrats
<i>committed step</i>	entscheidender Schritt
<i>counter</i>	Gegen-
<i>doped</i>	behandelt
<i>dot blot</i>	Punkt-Klecksmethode
<i>homing principle</i>	Zielführungs-Prinzip
<i>in line</i>	linear
<i>loop loop interaction</i>	Schleifeninteraktion
<i>peak</i>	Maximum
<i>primer</i>	Starteroligonukleotid
<i>reverse</i>	rückwärts
<i>Riboswitch, Riboswitches</i>	RNA-Schalter
<i>template</i>	Matrize
<i>three way junction</i>	T-Kreuzung



## 7.7 Lebenslauf

Karl von Laer, geboren am 22.05.1981 in Detmold

2008–2012	Promotion an der Goethe-Universität Frankfurt, der Universität Bonn und der Technischen Universität Darmstadt
2008	Abschluss: Diplom Biochemie
2007-2008	Diplomarbeit: Etablierung neuer Methoden in der Leukämiediagnostik, AG Marschalek, Institut für pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt
2002-2007	Studium Biochemie, Goethe-Universität Frankfurt, Schwerpunkte: Biophysikalische Chemie und Immunologie
2001-2002	Grundstudium Biochemie, FH Mannheim
2000-2001	Zivildienst als Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz, Bielefeld
2000	Abitur Hans-Ehrenberg-Schule, Bielefeld

## **7.8 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

## 8 Literatur

1. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
2. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
3. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) SELEX--A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, **24**, 381-403.
4. Pollard, J., Bell, S.D. and Ellington, A.D. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
5. Jhaveri, S.D. and Ellington, A.D. (2001), *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
6. Schmidtke, S.R., Duchardt-Ferner, E., Weigand, J.E., Suess, B. and Wohnert, J. (2010) NMR resonance assignments of an engineered neomycin-sensing riboswitch RNA bound to ribostamycin and tobramycin. *Biomol NMR Assign*, **4**, 115-118.
7. Steber, M., Hunsicker, A., Meitert, J., Mayer, G., Blind, M., Hillen, W., Behrens, C. and Suess, B. (2008), *submitted*.
8. Berens, C., Thain, A. and Schroeder, R. (2001) A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, 2549-2556.
9. Hunsicker, A., Steber, M., Mayer, G., Meitert, J., Klotzsche, M., Blind, M., Hillen, W., Berens, C. and Suess, B. (2009) An RNA aptamer that induces transcription. *Chem Biol*, **16**, 173-180.
10. Mayer, G. (2010) persönliches Gespräch. *Limes Institut, Bonn*.
11. Suess, B. (2009) persönliches Gespräch. *Goethe-Universität Frankfurt*.
12. Gal, S. (1998) Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function. *European Journal of Biochemistry*, **252**, 553-562.
13. Wallis, M.G., von Ahsen, U., Schroeder, R. and Famulok, M. (1995) A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol*, **2**, 543-552.
14. Mayer, G., Wulffen, B., Huber, C., Brockmann, J., Flicke, B., Neumann, L., Hafenbradl, D., Klebl, B.M., Lohse, M.J., Krasel, C. *et al.* (2008) An RNA molecule that specifically inhibits G-protein-coupled receptor kinase 2 in vitro. *RNA*, **14**, 524-534.
15. Dobbelsstein, M. and Shenk, T. (1995) In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *J Virol*, **69**, 8027-8034.
16. Schou, C. and Heegaard, N.H. (2006) Recent applications of affinity interactions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **27**, 44-59.
17. Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M. and Schluesener, H. (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem*, **276**, 16464-16468.
18. Goodman, S.D., Velten, N.J., Gao, Q., Robinson, S. and Segall, A.M. (1999) In vitro selection of integration host factor binding sites. *J Bacteriol*, **181**, 3246-3255.
19. Wittmann, A. and Suess, B. (2011) Selection of tetracycline inducible self-cleaving ribozymes as synthetic devices for gene regulation in yeast. *Mol Biosyst*, **7**, 2419-2427.
20. Misono, T.S. and Kumar, P.K. (2005) Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, **342**, 312-317.
21. Homann, M. and Göringer, H.U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2006-2014.
22. Mendonsa, S.D. and Bowser, M.T. (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem*, **76**, 5387-5392.
23. Marshall, K.A. and Ellington, A.D. (2000) In vitro selection of RNA aptamers. *Methods Enzymol*, **318**, 193-214.
24. Lorsch, J.R. and Szostak, J.W. (1994) In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*, **33**, 973-982.

25. Famulok, M. (1994) Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder. *Journal of the American Chemical Society*, **116**, 1698-1706.
26. Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. and Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1029-1036.
27. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**, 83-91.
28. Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M. and Winnacker, E.L. (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol*, **71**, 8790-8797.
29. Chivers, C.E., Koner, A.L., Lowe, E.D. and Howarth, M. (2011) How the biotin streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochemical Journal*, **435**, 55-63.
30. Haller, A.A. and Sarnow, P. (1997) In vitro selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8521-8526.
31. Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K. and Klussmann, S. (2003) Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res*, **31**, e130.
32. Vörtler, C.S. and Milovnikova, M. (2008), *Handbook of RNA Biochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 807-839.
33. Schuetze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Moerl, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M. *et al.* (2011) Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*, **6**, e29604.
34. Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Panke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stocklein, W., Dahmen, C. *et al.* (2007) One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnol*, **7**, 48.
35. Suess, B., Hanson, S., Berens, C., Fink, B., Schroeder, R. and Hillen, W. (2003) Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 1853-1858.
36. Kotter, P., Weigand, J.E., Meyer, B., Entian, K.D. and Suess, B. (2009) A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res*, **37**, e120.
37. Weigand, J.E. and Suess, B. (2007) Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4179-4185.
38. Kim, D.S., Gusti, V., Dery, K.J. and Gaur, R.K. (2008) Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows conditional control of splicing. *BMC Mol Biol*, **9**, 23.
39. Weigand, J.E., Sanchez, M., Gunnesch, E.-B., Zeiher, S., Schroeder, R. and Suess, B. (2008) Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, **14**, 89-97.
40. Lynch, S.A., Desai, S.K., Sajja, H.K. and Gallivan, J.P. (2007) A high-throughput screen for synthetic riboswitches reveals mechanistic insights into their function. *Chem Biol*, **14**, 173-184.
41. Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R. and Hillen, W. (2004) A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 1610-1614.
42. Symons, R.H. (1992) Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem*, **61**, 641-671.
43. Tang, J. and Breaker, R.R. (1997) Rational design of allosteric ribozymes. *Chemistry & Biology*, **4**, 453-459.
44. Wieland, M. and Hartig, J.S. (2008) Improved aptazyme design and in vivo screening enable riboswitching in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 2604-2607.

45. Auslander, S., Ketzer, P. and Hartig, J.S. (2010) A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. *Mol Biosyst*, **6**, 807-814.
46. Chen, Y.Y., Jensen, M.C. and Smolke, C.D. (2010) Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 8531-8536.
47. Steber, M., Arora, A., Hofmann, J., Brutschy, B. and Suess, B. (2011) Mechanistic basis for RNA aptamer-based induction of TetR. *Chembiochem*, **12**, 2608-2614.
48. Auslander, D., Wieland, M., Auslander, S., Tigges, M. and Fussenegger, M. (2011) Rational design of a small molecule-responsive intramer controlling transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **39**, e155.
49. Tucker, B.J. and Breaker, R.R. (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology*, **15**, 342-348.
50. Nudler, E. and Mironov, A.S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*, **29**, 11-17.
51. Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R. and Crothers, D.M. (2005) The Kinetics of Ligand Binding by an Adenine-Sensing Riboswitch. *Biochemistry*, **44**, 13404-13414.
52. Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R. and Crothers, D.M. (2005) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol Cell*, **18**, 49-60.
53. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C. and Breaker, R.R. (2003) Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus subtilis* and Other Bacteria. *Cell*, **113**, 577-586.
54. Edwards, T.E., Klein, D.J. and Ferre-D'Amare, A.R. (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 273-279.
55. Serganov, A. and Patel, D.J. (2009) Amino acid recognition and gene regulation by riboswitches. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 592-611.
56. Kim, J.N. and Breaker, R.R. (2008) Purine sensing by riboswitches. *Biol Cell*, **100**, 1-11.
57. Batey, R.T. (2011) Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **2**, 299-311.
58. Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H. and Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science*, **321**, 411-413.
59. Baker, J.L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R.B. and Breaker, R.R. (2012) Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science*, **335**, 233-235.
60. Dann Iii, C.E., Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I. and Winkler, W.C. (2007) Structure and Mechanism of a Metal-Sensing Regulatory RNA. *Cell*, **130**, 878-892.
61. Rinnenthal, J., Klinkert, B., Narberhaus, F. and Schwalbe, H. (2010) Direct observation of the temperature-induced melting process of the *Salmonella* fourU RNA thermometer at base-pair resolution. *Nucleic Acids Res*, **38**, 3834-3847.
62. Batey, R.T., Gilbert, S.D. and Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-415.
63. Mandal, M. and Breaker, R.R. (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 29-35.
64. Lemay, J.F., Penedo, J.C., Tremblay, R., Lilley, D.M. and Lafontaine, D.A. (2006) Folding of the adenine riboswitch. *Chem Biol*, **13**, 857-868.
65. Noeske, J., Buck, J., Furtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H. and Wohnert, J. (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res*, **35**, 572-583.
66. Wacker, A., Buck, J., Richter, C., Schwalbe, H. and Wohnert, J. (2012) Mechanisms for differentiation between cognate and near-cognate ligands by purine riboswitches. *RNA Biol*, **9**.

67. Soukup, G.A. and Breaker, R.R. (1999) Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA*, **5**, 1308-1325.
68. Gupta, S.K., Haigh, B.J., Griffin, F.J. and Wheeler, T.T. (2012) The mammalian secreted RNases: Mechanisms of action in host defence. *Innate Immunity*.
69. Lehnik-Habrink, M., Lewis, R.J., Mader, U. and Stulke, J. (2012) RNA degradation in *Bacillus subtilis*: an interplay of essential endo- and exoribonucleases. *Mol Microbiol*, **84**, 1005-1017.
70. Favre, D., Ngai, P.K. and Timmis, K.N. (1993) Relatedness of a periplasmic, broad-specificity RNase from *Aeromonas hydrophila* to RNase I of *Escherichia coli* and to a family of eukaryotic RNases. *Journal of Bacteriology*, **175**, 3710-3722.
71. Griffin, L.C., Tidmarsh, G.F., Bock, L.C., Toole, J.J. and Leung, L.L. (1993) In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood*, **81**, 3271-3276.
72. Keefe, A.D., Pai, S. and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 537-550.
73. Burnett, J.C. and Rossi, J.J. (2012) RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol*, **19**, 60-71.
74. Sanghvi, Y.S. (2011) A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, **Chapter 4**, Unit 4 1 1-22.
75. Bennett, C.F. and Swayze, E.E. (2010) RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **50**, 259-293.
76. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) Diversity of Oligonucleotide Functions. *Annual Review of Biochemistry*, **64**, 763-797.
77. Rhodes, A., Deakin, A., Spaul, J., Coomber, B., Aitken, A., Life, P. and Rees, S. (2000) The Generation and Characterization of Antagonist RNA Aptamers to Human Oncostatin M. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28555-28561.
78. Dougan, H., Lyster, D.M., Vo, C.V., Stafford, A., Weitz, J.I. and Hobbs, J.B. (2000) Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nuclear Medicine and Biology*, **27**, 289-297.
79. Schmidt, K.S., Borkowski, S., Kurreck, J., Stephens, A.W., Bald, R., Hecht, M., Friebe, M., Dinkelborg, L. and Erdmann, V.A. (2004) Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucl. Acids Res.*, **32**, 5757-5765.
80. Maasch, C., Vater, A., Buchner, K., Purschke, W.G., Eulberg, D., Vonhoff, S. and Klussmann, S. (2010) Polyethylenimine-polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein A1 (HMGA1) reduce tumor growth in vivo. *J Biol Chem*, **285**, 40012-40018.
81. Shukla, S., Sumaria, C.S. and Pradeepkumar, P.I. (2010) Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem*, **5**, 328-349.
82. Haasnoot, J. and Berkhout, B. (2009) Nucleic acids-based therapeutics in the battle against pathogenic viruses. *Handb Exp Pharmacol*, 243-263.
83. Cho, E.J., Lee, J.W. and Ellington, A.D. (2009) Applications of aptamers as sensors. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, **2**, 241-264.
84. Potyrailo, R.A., Conrad, R.C., Ellington, A.D. and Hieftje, G.M. (1998) Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal Chem*, **70**, 3419-3425.
85. Willner, I. and Zayats, M. (2007) Electronic aptamer-based sensors. *Angew Chem Int Ed Engl*, **46**, 6408-6418.
86. Yoon, H., Kim, J.H., Lee, N., Kim, B.G. and Jang, J. (2008) A novel sensor platform based on aptamer-conjugated polypyrrole nanotubes for label-free electrochemical protein detection. *Chembiochem*, **9**, 634-641.
87. Levy, M., Cater, S.F. and Ellington, A.D. (2005) Quantum-dot aptamer beacons for the detection of proteins. *Chembiochem*, **6**, 2163-2166.

88. Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. and Prohaska, E. (2002) An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem*, **74**, 4488-4495.
89. Baker, B.R., Lai, R.Y., Wood, M.S., Doctor, E.H., Heeger, A.J. and Plaxco, K.W. (2006) An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J Am Chem Soc*, **128**, 3138-3139.
90. Xiao, Y., Lubin, A.A., Heeger, A.J. and Plaxco, K.W. (2005) Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 5456-5459.
91. Lai, R.Y., Plaxco, K.W. and Heeger, A.J. (2007) Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum. *Anal Chem*, **79**, 229-233.
92. Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E.N., Carter, J., Dalby, A.B., Eaton, B.E., Fitzwater, T. *et al.* (2010) Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*, **5**, e15004.
93. Ostroff, R.M., Bigbee, W.L., Franklin, W., Gold, L., Mehan, M., Miller, Y.E., Pass, H.I., Rom, W.N., Siegfried, J.M., Stewart, A. *et al.* (2010) Unlocking biomarker discovery: large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer. *PLoS One*, **5**, e15003.
94. Keefe, A.D. and Schaub, R.G. (2008) Aptamers as candidate therapeutics for cardiovascular indications. *Curr Opin Pharmacol*, **8**, 147-152.
95. Lee, J.F., Stovall, G.M. and Ellington, A.D. (2006) Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 282-289.
96. Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R. and Adamis, A.P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 123-132.
97. Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L. and Janjic, N. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*, **273**, 20556-20567.
98. Cohen, M.G., Purdy, D.A., Rossi, J.S., Grinfeld, L.R., Myles, S.K., Aberle, L.H., Greenbaum, A.B., Fry, E., Chan, M.Y., Tonkens, R.M. *et al.* (2010) First Clinical Application of an Actively Reversible Direct Factor IXa Inhibitor as an Anticoagulation Strategy in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation*, **122**, 614-622.
99. McNamara, J.O., Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A. and Giangrande, P.H. (2006) Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotech*, **24**, 1005-1015.
100. Neff, C.P., Zhou, J., Remling, L., Kuruvilla, J., Zhang, J., Li, H., Smith, D.D., Swiderski, P., Rossi, J.J. and Akkina, R. (2011) An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med*, **3**, 66ra66.
101. Chen, C.H., Dellamaggiore, K.R., Ouellette, C.P., Sedano, C.D., Lizadjohry, M., Chernis, G.A., Gonzales, M., Baltasar, F.E., Fan, A.L., Myerowitz, R. *et al.* (2008) Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15908-15913.
102. Hwang, D.W., Ko, H.Y., Lee, J.H., Kang, H., Ryu, S.H., Song, I.C., Lee, D.S. and Kim, S. (2010) A Nucleolin-Targeted Multimodal Nanoparticle Imaging Probe for Tracking Cancer Cells Using an Aptamer. *Journal of Nuclear Medicine*, **51**, 98-105.
103. Hicke, B.J., Stephens, A.W., Gould, T., Chang, Y.F., Lynott, C.K., Heil, J., Borkowski, S., Hilger, C.S., Cook, G., Warren, S. *et al.* (2006) Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med*, **47**, 668-678.
104. Chang, S.S. (2004) Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev Urol*, **6 Suppl 10**, S13-18.

105. Lupold, S.E., Hicke, B.J., Lin, Y. and Coffey, D.S. (2002) Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res*, **62**, 4029-4033.
106. Bagalkot, V., Farokhzad, O.C., Langer, R. and Jon, S. (2006) An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 8149-8152.
107. Elander, R.P. (2003) Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**, 385-392.
108. Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G.A., Kishony, R., Kreiswirth, B.N., Kutter, E. *et al.* (2011) Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Micro*, **9**, 894-896.
109. Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F. and Mobashery, S. (2010) The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol*, **13**, 551-557.
110. Vollmer, W., Blanot, D. and de Pedro, M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 149-167.
111. Sauvage, E., Kerff, F., Ric, Terrak, M., Ayala, J.A. and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 234-258.
112. Lim, D. and Strynadka, N.C.J. (2002) Structural basis for the [beta] lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Mol Biol*, **9**, 870-876.
113. Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A. and Vollmer, W. (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, **10**, 123-136.
114. Marrero, A., Mallorqui-Fernandez, G., Guevara, T., Garcia-Castellanos, R. and Gomis-Rueth, F.X. (2006) Unbound and Acylated Structures of the MecR1 Extracellular Antibiotic-sensor Domain Provide Insights into the Signal-transduction System that Triggers Methicillin Resistance. *Journal of Molecular Biology*, **361**, 506-521.
115. Zapun, A., Contreras-Martel, C. and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 361-385.
116. Bush, K. (2008) Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 134-143.
117. Turner, P.J. (2005) Extended-Spectrum beta-Lactamases. *Clinical Infectious Diseases*, **41**, S273-S275.
118. Datta, N. and Kontomichalou, P. (1965) Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. *Nature*, **208**, 239-241.
119. Jacoby, G. and Bush, K. (2010).
120. Jevons, M.P., Coe, A.W. and Parker, M.T. (1963) Methicillin resistance in *Staphylococci*. *Lancet*, **1**, 904:907.
121. Hartman, B.J. and Tomasz, A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *staphylococcal aureus*. *J Bacteriol*, **158**, 513-516.
122. Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S.B. and Mobashery, S. (2004) The Basis for Resistance to {beta}-Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40802-40806.
123. Lu, W.P., Sun, Y., Bauer, M.D., Paule, S., Koenigs, P.M. and Kraft, W.G. (1999) Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Kinetic Characterization of Its Interactions with beta-Lactams Using Electrospray Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **38**, 6537-6546.
124. el Kharroubi, A., Jacques, P., Piras, G., Van Beeumen, J., Coyette, J. and Ghuysen, J.M. (1991) The *Enterococcus hirae* R40 penicillin-binding protein 5 and the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 2' are similar. *Biochem. J.*, **280**, 463-469.
125. Zorzi, W., Zhou, X.Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L. and Coyette, J. (1996) Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.*, **178**, 4948-4957.



126. Wendt, C., Rüden, H. and Edmond, M. (1998) Vancomycin-resistente Enterokokken: Epidemiologie, Risikofaktoren und Prävention. *Deutsches Ärzteblatt* **95**, A1604-A1611.
127. Hakenbeck, R., Tarpay, M. and Tomasz, A. (1980) Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 364-371.
128. Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J.M. and Spratt, B.G. (1989) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 8842-8846.
129. Asahi, Y., Takeuchi, Y. and Ubukata, K. (1999) Diversity of Substitutions within or Adjacent to Conserved Amino Acid Motifs of Penicillin-Binding Protein 2X in Cephalosporin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1252-1255.
130. Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K. and Walsh, T.R. (2009) Characterization of a New Metallo-beta-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 5046-5054.
131. Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S. *et al.* (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, **10**, 597-602.
132. Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R. and Livermore, D.M. (2011) The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology*, **19**, 588-595.
133. Bush, K. and Fisher, J.F. (2011) Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **65**, 455-478.
134. Pfeifer, Y., Witte, W., Holfelder, M., Busch, J., Nordmann, P. and Poirel, L. (2011) NDM-1-Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 1318-1319.
135. Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T.A., Gottig, S., Hunfeld, K.P., Seifert, H., Witte, W. and Higgins, P.G. (2011) Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*, **66**, 1998-2001.
136. Rasband, W.S. (1997-2012). U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
137. Musheev, M.U. and Krylov, S.N. (2006) Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Addressing the polymerase chain reaction issue. *Analytica Chimica Acta*, **564**, 91-96.
138. Bradford, P.A. (2001) Extended-Spectrum {beta}-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 933-951.
139. Osuna, J., Viadiu, H., Fink, A.L. and Soberón, X. (1995) Substitution of Asp for Asn at Position 132 in the Active Site of TEM beta-Lactamase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 775-780.
140. fold, R. (2008).
141. VoSz, B., Giegerich, R. and Rehmsmeier, M. (2006) Complete probabilistic analysis of RNA shapes. *BMC Biology*, **4**, 5.
142. Mayer, G.n., Wulffen, B., Huber, C., Brockmann, J.r., Flicke, B., Neumann, L., Hafenbradl, D., Klebl, B.M., Lohse, M.J., Krasel, C. *et al.* (2008) An RNA molecule that specifically inhibits G-protein-coupled receptor kinase 2 in vitro. *RNA*, **14**, 524-534.
143. Zakataeva, N.P., Gronskiy, S.V., Sheremet, A.S., Kutukova, E.A., Novikova, A.E. and Livshits, V.A. (2007) A new function for the *Bacillus* PbuE purine base efflux pump: efflux of purine nucleosides. *Research in Microbiology*, **158**, 659-665.

144. Kim, J.N., Roth, A. and Breaker, R.R. (2007) Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 16092-16097.
145. Burke, D.H. and Gold, L. (1997) RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2020-2024.
146. Sampson, T. (2003) Aptamers and SELEX: the technology. *World Patent Information*, **25**, 123-129.
147. Mayer, G. (2009) The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**, 2672-2689.
148. Ahmed, M.-S.L. and Mayer, G. (2010) Evolution of specific RNA motifs derived from pan-protein interacting precursors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 3793-3796.
149. Minasov, G., Wang, X. and Shoichet, B.K. (2002) An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J Am Chem Soc*, **124**, 5333-5340.
150. Suess, B. and Weigand, J.E. (2008) Engineered riboswitches: Overview, problems and trends. *RNA Biology*, **5**, 24-29.
151. Yang, H., Aitha, M., Hetrick, A.M., Richmond, T.K., Tierney, D.L. and Crowder, M.W. (2012) Mechanistic and Spectroscopic Studies of Metallo-beta-lactamase NDM-1. *Biochemistry*, **51**, 3839-3847.
152. Bae, I.K., Lee, B.H., Hwang, H.Y., Jeong, S.H., Hong, S.G., Chang, C.L., Kwak, H.S., Kim, H.J. and Youn, H. (2006) A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J Antimicrob Chemother*, **58**, 315-319.
153. Jones, R.N., Wilson, H.W., Novick, W.J., Jr., Barry, A.L. and Thornsberry, C. (1982) In vitro evaluation of CENTA, a new beta-lactamase-susceptible chromogenic cephalosporin reagent. *J Clin Microbiol*, **15**, 954-958.
154. Jones, R.N., Wilson, H.W. and Novick, W.J., Jr. (1982) In vitro evaluation of pyridine-2-azo-p-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other beta-lactam compounds. *J Clin Microbiol*, **15**, 677-683.
155. Hafner, M., Vianini, E., Albertoni, B., Marchetti, L., Grune, I., Gloeckner, C. and Famulok, M. (2008) Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nat. Protocols*, **3**, 579-587.
156. (2008).
157. Sharma, V., Nomura, Y. and Yokobayashi, Y. (2008) Engineering complex riboswitch regulation by dual genetic selection. *J Am Chem Soc*, **130**, 16310-16315.
158. Dixon, N., Duncan, J.N., Geerlings, T., Dunstan, M.S., McCarthy, J.E., Leys, D. and Micklefield, J. (2010) Reengineering orthogonally selective riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 2830-2835.
159. Edwards, A.L. and Batey, R.T. (2009) A Structural Basis for the Recognition of 2'-Deoxyguanosine by the Purine Riboswitch. *Journal of Molecular Biology*, **385**, 938-948.
160. Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J. and Rabinowitz, J.D. (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, **5**, 593-599.
161. Wacker, A., Buck, J., Mathieu, D., Richter, C., Wohnert, J. and Schwalbe, H. (2011) Structure and dynamics of the deoxyguanosine-sensing riboswitch studied by NMR-spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **39**, 6802-6812.
162. Wacker, A., Von Laer, K., Hänsel, R., Löhr, F., Dötsch, V., Suess, B. and Schwalbe, H. (2012) In-Cell NMR characterisation of Ligand Binding to Riboswitch RNAs. *submitted*.
163. Lambert, D. and Draper, D.E. (2007) Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg<sup>2+</sup> interactions. *J Mol Biol*, **370**, 993-1005.

164. Zhang, H. and Hao, Q. (2011) Crystal structure of NDM-1 reveals a common beta-lactam hydrolysis mechanism. *The FASEB Journal*.
165. Berens, C., Schnappinger, D. and Hillen, W. (1997) The Role of the Variable Region in Tet Repressor for Inducibility by Tetracycline. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6936-6942.
166. Laible, G., Hakenbeck, R., Sicard, M.A., Joris, B. and Ghuysen, J.M. (1989) Nucleotide sequences of the pbpX genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant, C506. *Molecular Microbiology*, **3**, 1337-1348.
167. Bio-Rad. *Biodot-Microfiltration Apparatus Manual*.
168. Michelsen, B.K. (1995) Transformation of *Escherichia coli* Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase. *Analytical Biochemistry*, **225**, 172-174.
169. Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
170. Harwood, C.C., SM. (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley Sons, Chichester.